

Justus, 1960

Lane

✓
Each

Aus der Chemisch-Physiologischen Abteilung des Veterinär-Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

TROCKENSUBSTANZBESTIMMUNGEN VON SÄUGETIERERYTHROZYTEN MIT DEM DREISPALTINTERFERENZMIKROSKOP

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades bei
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Günther Reißhauer
Veterinär-Praktikant aus Göhritz (Sa.)

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Gießen 1960

Aus der Chemisch-Physiologischen Abteilung des Veterinär-Physiologischen Institutes der Justus Liebig-Universität Gießen
Leiter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

TROCKENSUBSTANZBESTIMMUNGEN VON SÄUGETIERERYTHROZYTEN MIT DEM DREISPALTINTERFERENZMIKROSKOP

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades bei
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der
Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Günther Reißhauer
Veterinärpraktikant aus Göhritz (Sa.)

Gießen 1960

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. V. Horn

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Boguth

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 1960

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	5
2. Das Dreispaltinterferenzmikroskop	7
a) Die Dreispaltinterferenzen	7
b) Die Übertragung der Dreispaltinterferenzen auf das Mikroskop	10
c) Einrichtung des verwendeten Mikroskopes	11
d) Strahlengang und Bildentstehung	14
e) Die Interferenzerscheinung und Meßvorgang	17
f) Justierung des Gerätes	20
g) Korrekturen	21
h) Zweispaltinterferenzen	23
3. Zusammensetzung der Säugetiererythrozyten (Literatur)	28
4. Bestimmung der Trockenmasse der Erythrozyten mit dem Dreispaltinterferenzmikroskop	32
a) Ermittlung der Gangunterschiede	34
b) Bestimmung des Brechungsindex	36
c) Ermittlung der Fläche	38
d) Dichte	38
e) Durchführung der Messung	38
f) Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung des Gangunterschiedes	42
g) Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung des Durchmessers	44
5. Ergebnisse	46
6. Besprechung der Ergebnisse	51
7. Zusammenfassung	54
8. Literaturverzeichnis	56
9. Lebenslauf	59

1. EINLEITUNG

Die Interferenzmikroskopie gestattet es, aus dem optischen Verhalten biologischer Objekte quantitative Angaben über deren Gestalt und Massenverteilung zu ermitteln.

Hat ein Objekt gegenüber seiner Umgebung einen verschiedenen Brechungsindex, so wird der Lichtanteil, der das Objekt durchläuft, gegenüber dem, der daran vorbeigeht, eine Verzögerung oder Beschleunigung erfahren. Danach haben beide Lichtanteile einen Gangunterschied Δ , der folgendermaßen definiert ist:

$$\Delta = D (n_o - n_m)$$

Hierbei ist D die Dicke des Objektes, n_o sein Brechungsindex und n_m der Brechungsindex des umgebenden Mediums. Faßt man das Licht als eine Wellenerscheinung auf, dann kann man einen Gangunterschied auch als Verzögerung der Phasenwinkel beschreiben, die zwei zu vergleichende Lichtwellen gegeneinander haben. Sie heißt Phasendifferenz (φ) oder Phasenverzögerung und ist:

$$\varphi = - \frac{2\pi}{\lambda} D (n_o - n_m)$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichtes ist.

Alle Objekte, die das Licht in dieser Weise beeinflussen, heißen Phasenobjekte. Im Interferenzmikroskop wird die Phasenveränderung meßbar zum Ausdruck gebracht.

Biologische Zellen, isolierte Gewebsteile und andere Objekte, die in physiologischer Lösung, Wasser oder gar gegen Luft betrachtet werden, sind solche Phasenobjekte, weil ihr Brechungsindex durch ihren Salz- und Proteingehalt stark erhöht wird. Kennt man den Brechungsindex eines Objektes und bettet es in ein Medium von ebenfalls bekannten Brechungsindex ein, so kann man seine Dicke bestimmen, wenn man den Gangunterschied im Interferenzmikroskop gemessen hat.

Besondere Bedeutung hat das Interferenzmikroskop in der Biologie erlangt, da es möglich ist, die Trockensubstanz biologischer Objekte unter physiologischen Bedingungen zu ermitteln.

Adair und Robinson (1930) sowie später Barer und Tkaczyk (1954) konnten nachweisen, daß in Eiweißlösungen die Konzentration der Proteine dem Brechungsindex der Lösung über einen sehr weiten Konzentrationsbereich linear proportional ist. Es gilt:

$$n_o = n_m + \alpha K$$

wobei n_o der Brechungsindex der Lösung ist, n_m der des Lösungsmittels, K die Konzentration des gelösten Protein und α dessen spezifisches Inkrement.

Der Brechungsindex und damit die Konzentration lassen sich jedoch im Interferenzmikroskop nur aus zwei Messungen gegenüber verschiedenen brechenden Medien ermitteln, wenn nicht die Dicke des Objektes bekannt ist.

Untersucht man eine Zelle, die sich in einem physiologischen Milieu etwa einer Salzlösung befindet, und kann man voraussetzen, daß der Brechungsindex dieses Mediums dem der Flüssigkeit gleicht, die wir in der Zelle als Lösungsmittel für die anderen Zellbestandteile - in der Mehrzahl Proteine - annehmen, so kann man sagen

$$\frac{n_o - n_m}{K} = \alpha$$

n_o ist dabei der Brechungsindex der Zelle und n_m der des Mediums.

Andererseits ist aber

$$(n_o - n_m) \cdot D = \Delta$$

weshalb man $\Delta = \alpha \cdot K \cdot D$ erhält.

Es entsteht kein allzugroßer Fehler, wenn man das spezifische Inkrement des Eiweißes als Hauptbestandteil in einer Zelle, den weiteren Konzentrationsberechnungen zugrunde legt.

Die Konzentration wird in gr% der gelösten Substanz (Trockensubstanz Tgr) gemessen.

Danach ist

$$Tgr = \frac{\Delta \cdot \text{Fläche}}{\kappa \cdot 100}$$

Aus dem Gangunterschied einer Zelle kann also unmittelbar auf den Trockensubstanzgehalt geschlossen werden, wenn Δ und die Fläche bekannt sind, und die oben angeführten Voraussetzungen gegeben sind, daß der Brechungsindex der Umgebung dem des Lösungsmittels in der Zelle entspricht. Ist sie in Plasma suspendiert, so muß eine Korrektur für den Brechungsindex des Plasmas gemacht werden. Ebenso bei Messungen in Albuminlösungen höherer Konzentrationen.

Soll die Trockensubstanz einer isolierten aufgetrockneten Zelle gegenüber Luft bestimmt werden, so muß man ihr Volumen und das spezifische Gewicht kennen. Um das Zellvolumen zu bestimmen, benötigt man aber ihre Dicke und Fläche. Hat man den Gangunterschied im Interferenzmikroskop ermittelt, so kann man die Dicke der Zelle berechnen, wenn ihr Brechungsindex bekannt ist. Das Produkt aus Fläche, Dicke und spez. Gewicht ergibt ihre Trockenmasse. Zur Berechnung der Trockensubstanz aufgetrockneter Zellen gegenüber Luft ist es also notwendig, neben dem im Interferenzmikroskop gemessenen Gangunterschied das spez. Gewicht und den Brechungsindex der Zelle zu kennen.

Mit dem Dreispaltinterferenzmikroskop sollte die Möglichkeit geprüft werden, die Trockensubstanz von Erythrozyten in lufttrockenen Blutausstrichen zu bestimmen.

2. DAS DREISPALTINTERFERENZMIKROSKOP

a) Die Dreispaltinterferenzen

Väisälä (1922) benutzte neben anderen Interferenzmethoden eine Dreispaltanordnung, um kleinere astronomische Objektive und Parabol-

spiegel auf ihre Fehler zu untersuchen. Durch eine drei Spalte freigebende Blende, die er dem zu vermessenden Spiegel oder Objektiv vorsetzte, konnte er typische Interferenzerscheinungen erzeugen, aus deren räumlicher Lage er die Wellenflächen der Spiegel oder Objektive berechnen konnte.

Zernike (1950) verwendete dieses Verfahren, um die Gangunterschiede seiner Phasenplättchen für das Phasenkontrastverfahren zu ermitteln.

Wird ein Dreispalt parallel und monochromatisch beleuchtet, so entsteht hinter ihm ein Feld von Interferenzerscheinungen, das mit einer Lupe oder einem Fernrohr beobachtet werden kann. In verschiedener Entfernung vom Dreispalt zeigen die Beobachtungsebenen ein verschiedenes Aussehen, wobei bestimmte Interferenzbilder sich periodisch wiederholen, wenn die Entfernung vom Dreispalt einsinnig durchlaufen wird.

Zwei Typen von Interferenzbildern sind besonders charakteristisch. Sie liegen in ausgezeichneten Ebenen, den A- und B-Ebenen. (Menzel, 1954).

In den A-Ebenen haben die aus den Seitenspalten austretenden Lichtbündel gegenüber dem des Mittelspaltes einen Gangunterschied von 0, π oder einem Mehrfachen davon. Durch Überlagerung der drei Lichtbündel entsteht ein Beugungsbild, in dem sich hellere und schwächere Interferenzmaxima abwechseln.

In der A-Ebene mit dem Gangunterschied 0 ist ein zentrales helles Maximum von weniger hellen Maxima umgeben. Dasselbe Aussehen haben die A-Ebenen, in denen der Phasenunterschied der Seitenspalte zu dem des Mittelspaltes ein geradzahlig Vielfaches von π beträgt. In allen anderen Ebenen sind die stärkeren Maxima um eine halbe Periode seitlich versetzt, so daß ein zentrales, schwächeres Interferenzmaximum von zwei stärkeren umgeben wird. Dieses charakteristische Aussehen der A-Ebenen wird durch drei gleichbreite äquidistante Spalten hervorgerufen. Trägt jedoch am Beobachtungsort der Mittelspalt zur Interferenz

die gleiche Amplitude bei wie die beiden äußeren zusammen, so werden die schwächeren Interferenzmaxima ausgelöscht. Sichtbar bleiben nur die helleren Hauptmaxima. Das wird erreicht, indem man den mittleren Spalt doppelt so breit wie die äußeren macht (Zernike, 1950) oder einen Intensitätsausgleich benutzt, der die Amplitude der beiden äußeren auf die Hälfte reduziert. (Fleischmann und Schoper, 1951). Die Zahl der Interferenzstreifen vergrößert sich mit geringerer Breite der Spalte. ihre Helligkeit nimmt dagegen ab. Die endliche Breite der Spalte bedingt außerdem einen Helligkeitsabfall der Interferenzstreifen mit ihrem Abstand von der optischen Achse.

Die A-Ebene mit dem Gangunterschied 0 befindet sich bei parallel beleuchtetem Dreispalt im Unendlichen. Wird die Interferenzerscheinung mit einem Fernrohr beobachtet, so entsteht sie in der Bildebene des Fernrohrobjektives. Bei konvergent beleuchtetem Spalt ist der Konvergenzpunkt ihr Entstehungsort.

Beträgt der Gangunterschied zwischen den Lichtbündeln der Seitenspalte und des Mittelspaltes $m + \frac{1}{2} \pi$ ($m = 1, 2$), so entstehen die B-Ebenen. In ihnen haben alle Interferenzmaxima gleiche Helligkeit, abgesehen von dem monotonen Helligkeitsabfall senkrecht zur optischen Achse. Sie lassen sich recht genau fixieren und sind für die Messung besonders geeignet.

Beobachtet man jedoch in größerer Entfernung von der Bildebene des Fernrohrobjektives, kommt es nur noch teilweise im Interferenzbild zu äquidistanter Streifenbildung mit gleicher Helligkeit, da sich die Lichtbündel aus den einzelnen Spalten nur noch teilweise überlappen.

Beide Typen der Interferenzerscheinung gehen bei achsialer Verlagerung der Beobachtungsebene kontinuierlich ineinander über. Eine Intensitätsabnahme der Hauptmaxima geht einer Zunahme der Intensität in den Nebenmaxima parallel, bis in der B-Ebene alle Streifen gleiche Helligkeit besitzen, wenn sich der Beobachtungsort von einer A-Ebene zur B-Ebene verschiebt.

b) Übertragung der Dreispaltinterferenzen auf das Mikroskop

Die Spalte können nicht so klein hergestellt werden, um auch mikroskopisch kleine Objekte ausmessen zu können.

Menzel (1952, 1954) bildet deshalb einen Dreispalt verkleinert in die Objektebene eines Mikroskopes ab. Durch Verschieben des Objektes kann dies in jede gewünschte Lage zum Dreispalt gebracht werden. Die Beleuchtung geschieht durch einen die Lichtquelle vertretenden und der Kohärenzbedingung genügenden Beleuchtungsspalt. Seine Lage ist so im Beleuchtungssystem angeordnet, daß eine konvergente Durchstrahlung des Dreispaltbildes in der Objektebene erreicht wird, indem sein vom Kondensor entworfenes Bild in einer Ebene liegt, die sich wenig oberhalb der Objektebene befindet. In ihrer Umgebung entsteht das Feld der typischen Interferenzerscheinungen, das durch Anheben des Mikroskoptubus betrachtet werden kann.

Bei konvergenter Spaltbeleuchtung haben die einzelnen charakteristischen Ebenen einen unterschiedlichen Abstand. Dies erschwert die Messung.

Menzel (1957) hat deshalb im weiteren vorgeschlagen, ein parallel beleuchtetes Dreispaltbild in die Brennebene des Mikroskopobjektivs zu verlegen und die in der Pupille des Objektivs entstehenden Interferenzbilder durch eine Zwischenoptik im Mikroskop zu betrachten. Durch diese optische Anordnung werden die Abstände der typischen Interferenzebenen untereinander äquidistant, was die Messung sehr erleichtert. Die drei Spalte sind in rote Gelatine eingeschnitten. Im normalen Strahlengang des Mikroskopes liegt das vom Mikroskopobjektiv entworfene Bild des Dreispaltes im Unendlichen und wird durch ein Fernrohr betrachtet. Die durchsichtige rote Umgebung des Dreispaltes bewirkt, daß das Objekt sichtbar ist und eine entsprechende Orientierung zum Dreispalt erfolgen kann. Durch Einschalten der Zwischenoptik und eines grünen Filters, das komplementär zur Umgebung des Dreispaltes ist, kön-

nen die Interferenzerscheinungen betrachtet werden. Eine Phasenkontrasteinrichtung läßt sich zur Sichtbarmachung dünner Objekte erreichen. Um den Beleuchtungspalt wird ein roter lichtdurchlässiger Ring angebracht, dessen Bild auf das Phasenplättchen eines Phasenkontrastobjektives fällt, das jetzt an Stelle des üblichen Mikroskopobjektivs vorhanden ist.

v. Ardenne (1959) vereinfachte diese von Menzel angegebene Einrichtung eines Dreispaltinterferenzmikroskopes.

Auf eine Zwischenabbildung des Dreispaltes wird verzichtet. Er wird in der Objektebene unmittelbar über einem als Kondensator dienenden Objektiv angebracht. Dieses Objektiv hat eine relativ große Brennweite (etwa 100 mm). Der Konvergenzpunkt der den Dreispalt durchsetzenden Strahlen (gleichzeitig Bild des Beleuchtungspaltes und Entstehungsort der A-Ebene mit dem Gangunterschied 0) liegt unterhalb eines starken Okulars, durch das das Feld der Interferenzen beobachtet wird. Während der Messung befindet sich das Mikroskopobjektiv außerhalb des Strahlenganges. Dieses Gerät dient speziell der Dickenmessung von Ultramikrotomschnitten. Die auf eine Blende montierten Schnitte können im normalen Strahlengang mit eingeklapptem Mikroskopobjektiv nach Wunsch zum Dreispalt orientiert werden.

c) Einrichtung des verwendeten Mikroskopes.

Die zur Dreispaltinterferenzmikroskopie notwendigen Ergänzungen lassen sich in einem normalen Mikroskopstativ unterbringen. Es wurde ein Ortholuxstativ der Firma Leitz verwendet.

Als Lichtquelle dient eine Hg-Höchstdruckdampflampe CS 150 oder eine 35 Watt Glühlampe. Im Fuß des Stativs befindet sich dicht vor der Lichtquelle ein für die Aufnahme des Beleuchtungspaltes dienender

Einsatz. Die Lage des Spaltes ist durch vier Schrauben justierbar. Er muß so schmal sein, daß er den Dreispalt noch ausreichend kohärent beleuchtet. Seine Breite beträgt etwa 70μ , seine Höhe 3 mm. Ihn umgibt ein im Durchmesser je nach der verwendeten Optik verschieden groß, etwa 200μ breiter, lichtdurchlässiger Ring, der rot eingefärbt ist. Er dient zur Beobachtung im Phasenkontrast.

Um Objektstrukturen geringer Phasenänderung noch kontrastreich genug darstellen zu können, ist es notwendig, die durch den Beleuchtungsspalt gehenden und den Phasenkontrast störenden Lichtteile herauszublenzen. Das geschieht durch eine Blende, die vor den Beleuchtungsspalt geschoben werden kann und ihn abdeckt. Andererseits kann es für Durchmesserbestimmungen notwendig werden, daß eine Beobachtung im Phasenkontrast nicht statthaft ist. Eine zweite Blende kann den Beleuchtungsring verdecken. Beide sind auf einem Glasträger nebeneinander untergebracht, so daß ein seitliches Verschieben einen schnellen Wechsel der Beobachtung im Phasenkontrast und ohne ihn erlaubt.

Der Dreispalt, Kollektorlinse, Leuchtfeldblende und ein Oberflächenspiegel sind in einer Konstruktionseinheit zusammengefaßt, die sich fest im Fuß des Stativs verankern läßt. Der Dreispalt ist in rotgefärbte Gelatine eingeschnitten. Die Breite der Spalte richtet sich nach den zu untersuchenden Objektstrukturen. Er ist leicht auswechselbar dicht vor der Irisblende und dem Kollektor untergebracht. Maßgebend ist sein in die Objektebene projiziertes Bild. Es wird bestimmt von der Verkleinerung durch das Objektiv, das die Funktionen des Kondensors vertritt. Das Verhältnis von Spaltgröße zu Spaltabstand beeinflusst die Meßgenauigkeit. Vergrößert es sich, sind die einzelnen Ebenen weniger gut zu fixieren. Um noch eine ausreichende Helligkeit der Interferenzbilder zu erreichen, kann man die Spalte nicht beliebig klein machen. Daneben ist der Spaltabstand so zu wählen, daß die drei durch den Spalt gehenden Strahlenbüschel nur den Zentralteil des Mikroskopobjektives durchsetzen, damit die Bildfeldwölbung, die den meisten Objektiven eigen ist, nicht stört. Die Spaltbreiten für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden zwischen 50μ und 150μ angefertigt. Der Spaltabstand betrug $350\mu - 500\mu$.

Durch Kombination mit den verschiedenen Kondensor-Objektiven läßt sich die Breite der Spaltbilder in der Objektebene weitgehend variieren. Ein doppelt so breiter Mittelspalt der ebenfalls die Einstellgenauigkeit erhöht, wurde nur ausnahmsweise verwendet. Die Farbe der Umgebung der Spalte muß komplementär zu einem später vorzusetzenden Filter sein.

Zur Untersuchung mancher Objekte kann es sich als nützlich erweisen, wenn die Spaltlänge veränderlich ist. Sie läßt sich durch vorgesetzte Blenden, die die gleiche Farbe haben müssen, wie die Umgebung der Spalte, verkleinern oder vergrößern. Damit die Abbildung der Seiten- und Höhenbegrenzung der Spalte in die Objektebene hinreichend genau ist, müssen die Blenden genügend nahe an den Spalt herangebracht werden. Dem Dreispalt wird ein dünnes Deckglas aufgeklebt, und die Blenden unmittelbar über ihm angebracht. Die den Spalt nach unten begrenzende Blende ist unveränderlich auf dem Deckglas befestigt. Die obere kann in ihrer Höheneinstellung willkürlich geändert werden. Dies wird erreicht, indem sie an einem Halter befestigt ist, der mittels eines Gewindes nach oben oder unten verstellt werden kann.

Eine weitere Blende in der gleichen Farbe gestattet es, den Mittel- oder einen Seitenspalt abzudecken. Sie ermöglicht es, Zweispaltinterferenzen zu erzeugen, ohne den Spalt auswechseln zu müssen.

Als Kollektor dient ein Anastigmat von 8,5 cm Brennweite. Eine dem Kollektor vorgesetzte Irisblende erfüllt die Funktionen der Gesichtsfeldblende. An Stelle des Kondensors wird ein Mikroskopobjektiv verwendet.

Eine gute Möglichkeit, das Objekt in die zur Messung notwendige Position zum Dreispalt zu bringen, liefert die Verwendung eines Drehtisches mit einem aufschraubbaren Kreutztisch.

Der normale Mikroskoptubus wird durch einen Spezialtubus ersetzt, in dem alle Bauelemente untergebracht sind, die die Anwendung der Dreispaltmethode, wie sie Menzel beschrieben hat, notwendig macht. Er enthält als seine wesentlichsten Bestandteile 1. einen für die Aufnahme einer sphärischen und einer Zylinderlinse geeigneten Einsatz, 2. ein auf

Unendlich eingerichtetes Fernrohr und 3. ein Mikroskop-Objektiv, das durch eine justierbare Zange am Tubuskörper befestigt ist, wobei der Abstand Objektiv-Tubuskörper durch geeignete Zwischenstücke nach Bedarf verlängert werden kann.

Der Einsatz kann innerhalb des Tubus um etwa 6 cm gehoben bzw. gesenkt werden, und ist mit einer beleuchtbaren Skala versehen, die durch eine im Tubus befindliche Lupe betrachtet wird. Einem horizontalen Faden gegenüber kann man an der Skala die Höheneinstellung des Tubuseinsatzes auf 1/10 mm genau ablesen. Durch eine Wechsellvorrichtung kann einmal die sphärische Linse ($f = 12,4$) bzw. Zylinderlinse ($f = 12,4$) in den Strahlengang eingeschwenkt werden.

In einer dritten Einstellung liegen weder Zylinder- noch sphärische Linse in dem zwischen Objektiv und Fernrohr vollkommen freigegebenen Strahlengang.

Das Fernrohr wird von einem Achromaten ($f = 14,5$) und auswechselbaren Okular gebildet. Ein Oberflächenspiegel zwischen beiden lenkt den Strahlengang um 90° um. Eine horizontale Betrachtung des Mikroskopgesichtsfeldes ist somit möglich. Zur Beobachtung der Interferenzerscheinung kann dem Okular ein Filter vorgesetzt werden, das 1. komplementär zur Farbe des Dreispaltes ist und 2. die zur sicheren Beurteilung der Interferenzerscheinung notwendige Monochromasie liefert.

d) Strahlengang und Bildentstehung.

Über die Beleuchtungslinse fällt das Licht der Glühlampe oder der Hg-Höchstdrucklampe auf den Beleuchtungsspalt (BS). Er bildet stellvertretend die Lichtquelle. Die von ihm ausgehenden Strahlenbündel sind in Abb. 1 dargestellt. Als Kollektor wirkt Linse 1 und bildet BS als BS' in die vordere Brennebene des Objektivs 1 (O1) ab. Blende 1 (BLI) vermag

den Strahlengang nach Bedarf zu erweitern oder einzuengen. Sie erfüllt die Aufgabe der Gesichtsfeldblende.



Abb. 1

O₁ erzeugt durch die Lage des BS-Bildes in seiner Brennebene parallele Lichtbündel, die die Objektebene (OE) unter dem Aperturwinkel α durchstrahlen. Gleichzeitig entwirft O₁ vom Dreispalt (DS) ein Bild, das etwa in der Entfernung des Arbeitsabstandes des Objektivs hinter deren letzter Linsenfläche in der Objektebene entsteht. (Der Abstand des DS von O₁ ist etwas geringer als die Tubuslänge von 170 mm. DS und dessen Bild sind in der Abbildung nicht dargestellt.)

Objekt und das Bild von DS befinden sich in der vorderen Brennebene des Objektivs 2 (O₂), so daß ihre Bilder im Unendlichen entstehen, während das Bild des BS' in die hintere Brennebene von O₂ als BS'' abgebildet wird. Das Fernrohrobjektiv (FO) macht die von der Objektebene ausgehenden hinter O₂ parallelen Lichtbündel konvergent. In der vorderen Brennebene der Okularaugenlinse (OL) entsteht ein reelles Objektzwischenbild, was durch diese mit der Wirkung einer Lupe vergrößert und von der Linse des Auges auf die Netzhaut entworfen wird.

Nach Vorschalten des Filter (F) treffen nur noch die von den Spaltbildern herkommenden Strahlenbündel ins Auge, da F komplementär zur Umgebung von DS alle anderen Strahlen herausfiltert.

Wird die sphärische Linse (SL) - unterbrochen gezeichnet - in den Strahlengang eingeklappt, so ändert er sich im Folgenden:

SL richtet die aus ihrer Brennebene kommenden Strahlen parallel; man beobachtet also, wenn die sphärische Linse eingeschaltet ist, ihre vordere Brennebene. Da sie in achsialer Richtung verschiebbar ist, ihre Schnittweite in etwa dem Abstand der mittleren Höhenstellung des Tubuseinsatzes bis zur hinteren Brennebene von O2 entspricht, kann man nach ihrem Einklappen in den Strahlengang die Austrittspupille (in diesem Falle die hintere Brennebene von O2) erkennen. Damit entspricht sie ihrer Aufgabe, das Feld der Interferenzen in diesem Bereich sichtbar zu machen.

Wird die Zylinderlinse in den Strahlengang geklappt, so ist in dieser Ebene die Periode der Interferenzbilder ihrer Achse parallel. Es findet durch sie keine Beeinflussung des Strahlenganges statt. Die Strahlenbegrenzung in der Achse der Zylinderlinse ist demnach wie bei der Beobachtung ohne sie durch die Gesichtsfeldbegrenzung (Bild der Gesichtsfeldblende) in der Objektebene gegeben.

In der Ebene, die zu dieser senkrecht steht, ändert sich der Strahlengang wie folgt:

Die BS-Ausdehnung ist in dieser Richtung sehr gering und engt auch die Beleuchtungsapertur ein. Die Abbildungsverhältnisse durch Zylinderlinse und sphärische Linse entsprechen aber einander.

Vergleicht man die Abbildungsverhältnisse in beiden Ebenen, so stellt man fest:

Bei der Beobachtung mit der sphärischen Linse ist die Höhe der Interferenzen von der Höhe des als Austrittspupille wirkenden Bildes des BS in der hinteren Brennebene von O2 abhängig. Eine Vergrößerung des DS-Bildes in der Objektebene beeinflusst die Höhe der Interferenzerscheinung nicht. Bei der Betrachtung mit der Zylinderlinse ist die Begrenzung des Bildes in der Richtung senkrecht zu ihrer Achse ebenfalls durch die Ausdehnung der Interferenzerscheinung in der Pupille von O2 gegeben. Parallel zur Achse der Linse findet sie dagegen durch die

Höhenbegrenzung des DS-Bildes statt. Eine Vergrößerung des DS führt zu einer Verlängerung der Interferenzfiguren. Man erkennt hieraus, daß die Korrelation zwischen Objektebene und Interferenzerscheinung in Richtung parallel zum BS erhalten bleibt.

Zur Erläuterung der Zeichnung sei noch angeführt: BS' ist die Eintrittspupille von O1 und entspricht der Aperturblinde des Kondensors, während BS" die Austrittspupille des Mikroskopobjektives O2 darstellt. Ihr durch das Fernrohr entworfene Bild ist aber die Austrittspupille des Mikroskopes.

e) Interferenzerscheinung und Meßvorgang.

In der Umgebung der Pupille von O2 entstehen die Interferenzbilder des Dreispaltes. Sie resultieren aus der Überlagerung der Beugungerscheinungen der Einzelspalte. Menzel (1954, 1956) führte die Ableitung der Intensitätsverhältnisse in den einzelnen Ebenen rechnerisch durch.

Strohmaier (1953) hatte gezeigt, daß die Abstände der Interferenzebenen untereinander gleich sind, wenn der Dreispalt in der Brennebene des Fernrohrobjektives steht. Die Phasenverzögerung eines zu messenden Objektes wird durch die Verlagerung der B-Ebenen bestimmt, die eintritt, wenn das Objekt in zwei verschiedene Positionen zum Dreispalt gebracht wird. Bedeckt ein Objekt den Mittelspalt, so verlagert sich das gesamte Interferenzfeld in Richtung auf O₂ zu, während eine Seitenspaltsbedeckung die umgekehrte Wirkung zur Folge hat.

Nach Menzel (1957) ergibt sich der Betrag der Phasenverzögerung eines Objektes zu

$$\varphi = \frac{\pi}{c-c_1} \left(\frac{z_1 - z_1'}{z_1 - z_2} + m \right)$$

Hierin beschreiben c und c' den Faktor, mit welchem zwei verschiedene Spaltbedeckungen in die Rechnung eingehen. Ihre Größe ist der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen:

OOO	XXX	OXO	XOX	XXO	XOO
$c = 0$	$c = 0$	$c = +1$	$c = -1$	$c = +1/2$	$c = -1/2$

O kennzeichnet einen Spalt ohne Objekt

X ist das Symbol für einen bedeckten Spalt.

z_1 und z_2 sind die Koordinaten der B-Ebenen mit dem Gangunterschied $-\frac{\pi}{2}$ und $+\frac{\pi}{2}$

z_1' ist die Koordinate der B-Ebene, die durch die Phasenverzögerung des Objektes verlagert wird.

Ist die Phasenverzögerung eines Objektes größer als π , so kann das Mehrfache m davon nicht mit dem Dreispaltverfahren ermittelt werden. Zu seiner Bestimmung sind die Zweispaltinterferenzen geeignet. Soll anstelle der Phasenverzögerung der Gangunterschied Δ angegeben werden, so ist zu schreiben

$$\Delta = \frac{\lambda}{2(c-c_1)} \left(\frac{z_1 - z_1'}{z_1 - z_2} + m \right)$$

Befinden sich Zylinderlinse, sphärische Linse und Filter außerhalb des Strahlenganges, kann das Objekt beobachtet werden.

Das Bild des Dreispaltes wird in die Objektebene scharf abgebildet, indem O_1 mittels Kondensorbetrieb gehoben bzw. gesenkt wird. Je nach Ausdehnung und Lage des Objektes können die verschiedenen Spaltbedeckungen gewählt werden.

Nach Einschalten einer der Zwischenlinsen in den Strahlengang kann die Interferenzerscheinung betrachtet werden. Die B-Ebenen sind eingestellt, wenn alle Interferenzstreifen gleiche Intensität haben. Ihre Koordinaten können an der Skala abgelesen werden, die die Höheneinstellung des Tubuseinsatzes angibt.

Die Objekte müssen in einer homogenen Umgebung und in sich homogen sein, sowie den Spalt in gesamter Ausdehnung ausfüllen, wenn die Interferenzerscheinung mit der sphärischen Linse betrachtet werden soll. Beobachtet man dagegen mit der Zylinderlinse, so bleibt die Korrelation zwischen Objekt und Interferenzen in Richtung zur Längsausdehnung des Spaltes erhalten. Inhomogenitäten in größeren Objekten können damit erfaßt werden. Auch lassen sich flächenförmige Objekte so zum Spalt orientieren, daß der Dreispalt in verschiedenen Abschnitten eine verschiedene Bedeckung zeigt. Die Interferenzerscheinungen in diesen Bereichen sind gleichzeitig sichtbar, und die charakteristischen B-Ebenen können eingestellt werden, ohne das Objekt verschieben zu müssen. Ob die zur Messung dünner Objekte, etwa Ultramikrotom-schnitte, am zweckmäßigsten genommene Bedeckung XXO und XOO noch eine ausreichende Höhe der Interferenzen in den einzelnen Bereichen liefert, um eine exakte Messung durchführen zu können, hängt von der Orientierungsmöglichkeit des Präparates zum Spalt und dessen Länge ab. Es muß möglichst schräg gelagert werden, die einzelnen Spalte sollen eng und ihr Abstand groß sein.

Kleine Objekte kann man gegebenenfalls gut zum Spalt orientieren, wenn bereits das Filter vor das Okular gesetzt ist. Auch läßt sich die Scharfstellung der Spalte (Unendlichstellung) nach Vorsetzen des Filters gut überprüfen.

f) Justierung des Gerätes

Einwandfreie Interferenzbilder und damit eine genaue Messung bedingen eine sorgfältige Justierung des Gerätes. Es ist dadurch eine möglichst zentrale Durchstrahlung aller insbesondere der im Interferenzstrahlengang liegenden optischen Teile zu erreichen.

Es hat sich für die Justierung folgendes Vorgehen bewährt: Man betrachtet mit der sphärischen Linse den Phasenring des Mikroskopobjektives. Dieses läßt sich leicht durch die Zentrierschrauben zur Mittelstellung bringen, wenn ein Okular mit Fadenkreuz verwendet wird.

Nach Herausklappen der sphärischen Linse erscheint das DS-Bild im Gesichtsfeld. Die Justiereinrichtung des Kondensors erlaubt es, dieses in die Mitte des Gesichtsfeldes zu bringen. Seine Lage in der Objektebene wird fast ausschließlich durch O1 bedingt. Ein Verschieben von Kollektor oder DS macht sich nur sehr unwesentlich auf die Lage des Bildes in der Objektebene bemerkbar. Schwierigkeiten kann die Justierung des BS-Bildes in der hinteren Brennebene von O2 bringen. Position des Beleuchtungspaltes und Stellung der Kollektorlinse haben beide auf die Lage des BS-Bildes Einfluß. Mit einiger Sicherheit ist die Kollektorlinse zur Mittelstellung gebracht, wenn eine gleichmäßige Ausleuchtung des DS-Bildes in der Objektebene erreicht ist.

Hierauf kann bei Betrachtung der hinteren Brennebene von O2 der Beleuchtungspalt in seinem Einsatz durch die Justierschrauben so orientiert werden, daß seine Mittelstellung erreicht wird. Bei der Betrachtung mit der sphärischen Linse muß die Mitte des BS-Bildes in der Pupille von O2 und bei Objektbetrachtung Mitte des Objektfeldes, - also Mitte des mittleren DS-Bildes - jeweils im Okular am gleichen Ort erscheinen.

Der DS wird entsprechend der Beleuchtungsapertur unter verschiedenen Winkeln durchstrahlt. Bei der Beobachtung mit der sphärischen Linse besteht aber längs der Interferenzstreifen in der Pupille von O2 eine vollständige Korrelation zu der Längsausdehnung von BS. Die Beleuchtungsapertur wird sich oberhalb und unterhalb der optischen Achse in der Weise bemerkbar machen, daß in einer B-Ebene in der Mitte des Interferenzbildes die Streifen gleiche Intensität haben, während darüber und darunter entsprechend der Beleuchtungsapertur mit wachsendem Abstand von der optischen Achse ein zunehmender Intensitätsunterschied auftritt. Zur Messung beobachtet man in der Nähe der optischen Achse und braucht eine Aperturkorrektur nicht vorzunehmen, wenn stets an der gleichen Stelle des Interferenzbildes gemessen wird. (Menzel, 1954). Dies erleichtert ein horizontaler Faden im Okular. Ist die Justierung des Gerätes ungenügend, so wandern die Interferenzbilder während der Höhenverstellung der sphärischen Linse seitlich oder der Höhe nach durch das Gesichtsfeld. Erfahrungsgemäß lassen sich kleinere Abweichungen leicht übersehen. Je nach Aperturgröße und Höhenverschiebung des Interferenzbildes kann sich hieraus eine Fehlmessung ergeben. Es sind ebenfalls Justierfehler, wenn sich die Interferenzlinien der B-Ebenen scherenartig durchsetzen, anstatt den normalen Verlauf zu zeigen, wobei sich die Intensität der Interferenzstreifen nur entsprechend der Beleuchtungsapertur im Abstand von der optischen Achse ändert.

g) Korrekturen.

Die Amplitude stark beeinträchtigenden Phasenobjekte bewirken keinen systematischen Meßfehler. Die Meßgenauigkeit wird dadurch zum Teil jedoch erheblich eingeschränkt. Menzel (1954) zeigte die Intensitätsverhältnisse in den A- und B-Ebenen bei verschiedenen aus den einzelnen Spalten kommenden Amplitudenverhältnissen auf. Fleischmann und Schopper (1951) haben zu diesem Zweck den Intensitätsausgleich einge-

führt. Zernike (1950) erweiterte den Mittelspalt auf das Vierfache der Breite der Seitenspalte. Die zur Untersuchung kommenden biologischen Objekte zeigen im allgemeinen eine weniger starke Absorption. Für die durchgeführten Untersuchungen ließen sich amplitudenregulierende Mittel entbehren.

Ein planparalleler Objektträger beeinflusst die Messung nicht. Eventuelle Schlieren, die sich in ihm befinden, sind an ihrer Wirkung auf das Interferenzbild zu erkennen. Ihre Prüfung kann folgendermaßen geschehen. Es wird die Lage einer gut fixierbaren B-Ebene ohne Objektträger bestimmt. Dann wird unter Objektträgerdurchstrahlung an verschiedenen Orten die gleiche Interferenz-Ebene vermessen. Festgestellte Unterschiede schließen einen Objektträger zur Verwendung aus.

Die Voraussetzung dafür, daß der Abstand der typischen Interferenzebenen untereinander gleich ist, bildet die Anordnung der optischen Elemente, daß ebene Wellen die Interferenzerscheinungen hervorrufen, was durch die Lage von DS' in der vorderen Brennebene von O2 erreicht wird. Trifft diese Bedingung nicht zu, dann treten Meßfehler auf, soweit die Phasenverzögerung nach der angegebenen Formel berechnet wird. Es kann dies einmal dadurch bedingt sein, daß das Fernrohr des Mikroskop-tubus nicht auf Unendlich eingestellt ist, oder während der Messung das Scharfstellen des DS-Bildes in der Objektebene nicht hinreichend genau erfolgt ist. Nach Menzel (1957) ist die erforderliche Einstellgenauigkeit auch für starke Objektive gewährleistet, so daß bei sorgfältiger Focusierung von DS ein Fehler nicht auftreten kann. Wie bereits ausgeführt, ist eine Beleuchtungskorrektur für die Beobachtung mit der sphärischen Linse nicht nötig. Bei der Beobachtung mit der Zylinderlinse ist die Längsausdehnung der Interferenzstreifen der Längsausdehnung des DS korreliert. Das bedeutet, daß in einem Punkt der Interferenzerscheinung Lichtbündel sich überlagern, die das Objekt in verschiedenen Richtungen durchsetzt haben. Für jeden Punkt der Interferenzerscheinung ist somit die gesamte Beleuchtungsapertur wirksam. Nach Menzel (1957) beträgt das hierbei zu berücksichtigende Korrekturglied $\frac{A^2}{6n}$, so daß die Gleichung

zur Berechnung der Phasenverzögerung jetzt lautet:

$$\varphi(1) + \frac{A^2}{6n} = \frac{\pi}{c-c'} \left(\frac{z_1 - z_1'}{z_1 - z_2} + m \right)$$

Die Größe des Korrekturgliedes ist in der Praxis experimentell zu ermitteln. Man mißt mit der sphärischen Linse, die keiner Aperturkorrektur bedarf und wiederholt die Messung mit der Zylinderlinse. Der Unterschied zwischen beiden gibt den Korrekturfaktor an, der durch die Längsausdehnung von BS, die Brennweite von O und den Brechungsindex des Mediums zwischen O und DS gegeben ist.

h) Zweispaltinterferenzen.

Die Interferenzerscheinung des Dreispaltes resultiert aus der Überlagerung dreier Strahlenbüschel, wobei der Mittelstrahl den beiden Randstrahlen gegenüber einen Gangunterschied hat, der eine Funktion des Beobachtungsortes auf der optischen Achse ist. Wird anstelle von DS ein Zweispalt (ZS) in die Objektebene abgebildet und unter den gleichen Beobachtungsvoraussetzungen untersucht, so entstehen in der Pupille von O2 Fraunhoferinterferenzen dieses Zweispaltes (Menzel, 1957). Die auftretenden Interferenzstreifen sind äquidistant und zeigen keine Intensitätsänderungen, wenn außerhalb der Bildebene von O2 beobachtet wird.

Durch die endliche Größe der Zweispalte entstehen eine begrenzte Anzahl von Interferenzstreifen mit einem monotonen Helligkeitsabfall nach den Seiten hin. Je schmaler die verwendeten Spalte sind, um so mehr Streifen entstehen.

Die gewählte Anordnung der Optik bewirkt, daß die in der Brennebene von O2 interferierenden ebenen Wellenflächen gegeneinander geneigt sind. Der Neigungswinkel ist dem Streifenabstand umgekehrt proportional. Er ist abhängig vom Spaltabstand in der Objektebene und der Brennweite des O2. Die Mitte des Interferenzbildes bildet das Maximum 0. Ordnung. An Orten, wo der Gangunterschied π beträgt, entstehen dunkle Streifen, die Interferenzminima. Zwischen zwei Orten gleicher Intensität beträgt der Gangunterschied 2π . Ihr Abstand sei ϵ . Ein die Phase des Lichtes um φ verzögerndes Objekt versetzt die Streifen um $\frac{\varphi}{2} \cdot \epsilon$, es hat den Gangunterschied $\Delta = \frac{\varphi}{2\pi} \cdot \lambda$

Mit Hilfe der Zweispaltinterferenzen ist es möglich, größere Gangunterschiede zu ermitteln. Sie ergänzen dadurch das Dreispaltverfahren, mit dem der Gangunterschied eines Objektes gemessen werden kann, ohne Angabe, ob dieser ein Einfaches oder Vielfaches von λ ist. Bei der Beleuchtung mit polychromatischem Licht besteht die Interferenzerscheinung aus weißen Streifen, die von farbigen Rändern umgeben sind. Der zentrale Streifen mit dem Gangunterschied 0 wird von zwei farblos dunklen Streifen umgeben. Wird einer der beiden Spalte mit einem phasenverzögernden Objekt bedeckt, besitzt dieses normale Dispersion, und ist seine Dispersion größer als die der Umgebung, so ist der 0-Streifen nach der gleichen Seite hin verschoben, wie das Streifensystem. Er ist aber nicht mehr symmetrisch von dunklen Streifen umgeben, sondern nur noch von einem, der vom Nullstreifen in derselben Richtung liegt, wie das gesamte Streifensystem nach Bedeckung mit dem Objekt verschoben wurde. (Menzel 1959).

Ein Dreispalt läßt sich durch Verschieben einer geeigneten Blende, die zweckmäßigerweise in der gleichen Farbe wie die Umgebung von DS gehalten ist, zur Erzeugung von Zweispaltinterferenzen verwenden. Wird ein Seitenspalt bedeckt, so liegen die Interferenzstreifen weiter auseinander als bei der Mittelspaltbedeckung. Dadurch läßt sich in gewisser Weise die Zweispaltgröße den Erfordernissen des Objektes anpassen. Zur Ermittlung größerer Gangunterschiede wird das Objekt so zum

ZS orientiert, daß nur ein Spalt und dieser auch nur teilweise bedeckt ist.

Die optische Anordnung ist die gleiche wie beim Dreispaltverfahren. ZS wird verkleinert in die Objektebene abgebildet und über O2 und Tubusfernrohr sichtbar gemacht. Die Transparente, rote Umgebung von ZS läßt das Objekt deutlich erkennen. Man betrachtet die Interferenzerscheinung ausschließlich mit der Zylinderlinse. Ein Objekt bewirkt dadurch eine Lateralverschiebung der Interferenzstreifen, die seiner Phasenverzögerung in der Längsrichtung des Spaltes entspricht.

Bei der Beobachtung im weißen Licht bewirkt die Durchsichtigkeit der Umgebung von ZS, daß neben den Interferenzstreifen das Bild des Beleuchtungsspaltbildes sichtbar ist. Man stellt durch achsiale Verschiebung der Zylinderlinse dessen Bild scharf und sieht ihn als roten Streifen dem Maximum 0. Ordnung überlagert. Die durch ein Objekt bewirkte Seitwärtsverschiebung der Interferenzstreifen beeinflußt die Lage des Beleuchtungsspaltbildes nicht. Man kann so die Verschiebung des kenntlichen O-Streifens gegenüber dem Beleuchtungsspaltbild feststellen und gelangt damit zum Gangunterschied des Objektes (Menzel, 1957). Die Verschiebung betrage p Streifenbreiten. So ist der Gangunterschied

$$\Delta = \lambda \cdot p$$

Das Auffinden des O-Streifens kann Schwierigkeiten bereiten. Eine Hilfe bildet das Verhalten der verlagerten Streifen, insbesondere wenn im monochromatischen Licht betrachtet wird. Die gegeneinander versetzten Interferenzminima sind durch Verbindungsstücke verbunden (Abb. 2), wenn nicht durch schroffe Änderungen des Brechungsindex im Präparat die Interferenzstreifen so steil abgelenkt werden, daß ihr Verlauf nicht mehr eindeutig festzustellen ist.

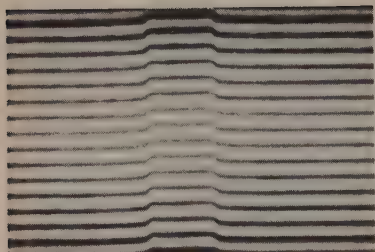


Abb. 2

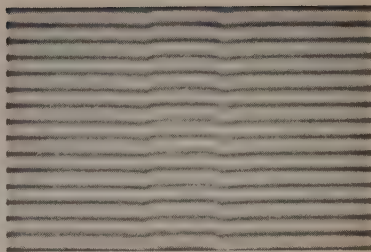


Abb. 3

Ebenso erhält man bei der Beobachtung im monochromatischen Licht einen ersten Überblick über die Phasenverhältnisse im Objekt. Aus Abbildung 2 ist der Gangunterschied zu erkennen, den ein Erythrozyt gegenüber seiner Umgebung bewirkt. Er bedeckt einen Spalt teilweise und verursacht eine Verschiebung der Interferenzstreifen entsprechend seiner Phasenverzögerung. Man erkennt, daß die Streifenverschiebung etwa $p/2$ beträgt, die einen Gangunterschied von $\frac{\lambda}{2}$ entspricht, und daß die Phasenverzögerung über dem vom spaltbedeckten Erythrozytenbereich sehr einheitlich ist.

Abb. 3 stellt das Zweispaltinterferenzbild eines im Blutausstrich enthämoглоbinisierten Erythrozyten dar. Die Streifenversetzung ist wesentlich geringer und in der zu Abb. 2 entgegengesetzten Richtung, obwohl die gleiche Spaltbedeckung gewählt wurde, da der Gangunterschied im Bereich des entleerten Erythrozyten geringer ist als der seiner Umgebung. Da die ZS-Interferenzen mit einer Zylinderlinse betrachtet werden, gelten für eine Aperturkorrektur ähnliche Überlegungen wie bei den Dreispaltinterferenzen. Nach Menzel (1957) ergibt sich für Messungen im Durchlicht der Gangunterschied des Objektes zu

$$\Delta \left(1 \cdot \frac{A^2}{6n} \right) = \lambda \cdot p$$

Gegenüber allen anderen Interferenzmikroskopen, die hohe Anforderungen an die optische Qualität und mechanische Stabilität ihrer Teile stellen, zeichnet sich das Dreistrahlinterferenzmikroskop wegen seiner apparativen Einfachheit aus. Während in den erstgenannten Geräten Strahlenteilung und Zusammenführung so stattfindet, daß das Gesichtsfeld Ort der Interferenzerscheinung ist, liegt beim Dreispaltinterferenzmikroskop die Interferenzerscheinung in der Austrittspupille des Mikroskopobjektives und muß mit einer Zwischenoptik betrachtet werden. Die Strahlenteilung im Meß- und Vergleichsstrahl wird erreicht, indem aus einem kohärenten Lichtstrahl durch den Drei- bzw. Zweispalt die einzelnen Lichtsonden herausgeblendet werden. In allen anderen Geräten sind es physikalische Mittel wie Doppelbrechung oder partielle Reflexion, die die Strahlenteilung und Überlagerung herbeiführen. Objektbild und Interferenzerscheinung fallen nicht zusammen, es ist somit ein indirektes Verfahren.

Bei der Beobachtung mit der sphärischen Linse können nur nahezu homogene Objekte in einer homogenen Umgebung untersucht werden. Bei der Beobachtung mit der Zylinderlinse bleibt dagegen in einer Richtung die Korrelation zwischen Objekt und Interferenzerscheinung erhalten. Es kann in dieser Dimension auch als abbildendes oder direktes Verfahren Verwendung finden.

Der Anwendungsbereich des Dreispaltinterferenzmikroskopes ist durch diese Verhältnisse eingeschränkt. Dennoch können auch biologische Objekte untersucht werden. Besonders geeignet ist es u. a. auch zur Schicht- oder Schnittdeckenbestimmung dünner Teile etwa von Ultramikrotomschnitten.

3. ZUSAMMENSETZUNG DER SÄUGETIER- ERYTHROZYTEN.

Trotz umfangreicher Forschungen sind die Ansichten über den Aufbau der Säugetier-Erythrozyten nicht einheitlich. So wird die Frage nach einer möglichen Innenstruktur von den verschiedensten Autoren unterschiedlich beantwortet.

Rollets Auffassung, daß sich in den Maschen einer farblosen Matrix, welches das Innere des roten Blutkörperchen ausfülle, das Hämoglobin befinde, blieb nicht lange unwidersprochen. Bidloo glaubte, die Erythrozytenhülle umgebe ein strukturloses Inneres, in dem das Hämoglobin und die Salze gelöst seien. (Ponder 1948).

Obwohl elektronenoptische Untersuchungen an hämolysierten Blutkörpern eindeutig das Fehlen jeder Innenstruktur nachweisen konnten, schließen diese Befunde dessen Existenz nicht aus, da nur die den vielfachen Behandlungen unterworfenen Blutkörperchenreste untersucht werden. Ponder diskutiert noch eingehend beide Auffassungen (1848, 1955).

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen interessierte die Frage nach der Innenstruktur, d. h. inwieweit neben dem Hämoglobin und den reinen Blutkörperchenhüllen noch andere Stoffe am Aufbau beteiligt sind, welche die Menge der Trockensubstanz beeinflussen können.

Über die Zusammensetzung der Erythrozyten lassen sich der Literatur folgende Angaben entnehmen.

Nach Dukes (1942) ist der Wassergehalt der Säugetiererythrozyten 59 - 64%, der Hämoglobingehalt 30 - 33% und der der Gesamttrockenmasse 36 - 41%.

Das Hämoglobin beträgt nach Ponder (1948) im roten Blutkörper des Menschen 29×10 gr/Zelle, der Wassergehalt 63×10 gr/Zelle und der Gehalt an Proteinen außer Hämoglobin $0,78 \times 10$ gr/Zelle.

Albritten (1953) gibt dagegen einen Gesamtproteingehalt von 36,8 gr/ml gegenüber einem Hb-Gehalt von 33,5 gr/ml im menschlichen Erythrozyten an, während die Trockensubstanz 37,0 gr/ml betragen soll.

Nach Bürker (1950) macht das Hämoglobin $\frac{1}{3}$ der feuchten roten Blutkörperchen und $\frac{4}{5}$ ihre Trockensubstanz aus.

Viele übereinstimmende Angaben geben die Konzentration des Hämoglobins im Erythrozyten zu 35 gr/ml an. Ponder (1948). Da die Dichte des Hb etwa 1,32 - 1,34 beträgt, müssen etwa 25% des Raumes von Hämoglobin ausgefüllt werden. Das Zellvolumen, das für Wasser in Anspruch genommen wird, beträgt 70%. Für alle anderen Substanzen bleiben dann weniger als 5%.

Stern, Reiner und Silber (1945) führten elektrophoretische Untersuchungen an Erythrozytenhämolysaten vom Menschen, dem Hund und Huhn durch. Sie konnten zwei farblose, opaleszierende Komponenten nachweisen, die sich als a- und b-Protein bezeichneten. Eine quantitative Auswertung der Versuchsergebnisse war ihnen nicht möglich. Sie konnten aber feststellen, daß die zwei Komponenten nur einen kleinen Teil (wenige Prozente) des Hämoglobingehaltes darstellen. Sie schätzten den Anteil der a-Komponente auf 2 - 5%. Die erhaltenen Werte von Mensch und Hund lagen in denselben Größenordnungen. Beim Huhn konnten sie eine Fraktion darstellen, die sie als c-Protein bezeichnen. Sie erwähnen, daß aus nicht näher untersuchten Rattenhämolysaten ein farbloses Präzipitat zu erhalten war, das in den Hämolysaten menschlicher Erythrozyten und denen des Hundes fehlte.

Beams und Hines (1944) untersuchten die Erythrozyten von Ratten in der Ultrazentrifuge. Zu diesem Zweck zentrifugierten sie die Milz dieser Tiere, fixierten sie und färbten die Schnitte. Sie stellten fest, daß der Erythrozyteninhalt in zwei bzw. drei Zonen sedimentierte, die selektiv färbbar waren. Die roten Blutkörperchen schienen in Richtung der Zentrifugalkraft gestreckt zu sein und ihre bikonkave Gestalt verloren zu haben, was sie darauf zurückzuführen glaubten, daß eine Innenkonstruk-

tur der Erythrozyten, die verantwortlich für ihre konstante Form ist, zerstört wird. Ihre Beobachtungen machte es ihnen unwahrscheinlich, anzunehmen, daß das Innere des Erythrozyten eine strukturlose Masse sei. Die in den verschiedenen Zonen sedimentierten Abschnitte konnten sie allerdings nicht identifizieren.

Ältere Untersucher analysierten die Zusammensetzung der Erythrozyten sehr eingehend.

Kanitz (1925) gibt im Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere die Zusammensetzung der Trockensubstanz der Erythrozyten für Mensch und Hund wie folgt an:

	Mensch	Hund
Hämoglobin	86,8 - 94,4 %	86,5 %
Eiweiß	5,1 - 12,2 %	12,6 %
Lezithin	0,35 - 0,7 %	0,6 %
Cholesterin	0,25 %	0,4 %

Dukes (1942) mißt vor allem den Ergebnissen von Abderhalden größeren Wert bei. Nach dessen umfangreichen Untersuchungen über die Zusammensetzung der Erythrozyten der verschiedenen Tierarten ist der Anteil der Trockenmasse beim Rind 22,5 % (weiblich), 16,5 % (männlich), Ziege 17 %, Pferd 14,3 %, Kaninchen 10 % und Hund 7,9 - 11,9 % höher als deren Hämoglobingehalt. (Gesamtrockensubstanz = 100). Aus allen Zahlenangaben über die Zusammensetzung der roten Blutkörperchen ist zu entnehmen, daß der weitaus größte Teil der Trockensubstanz neben dem Hämoglobinanteil vorwiegend aus Eiweiß und in geringerem Grade aus Lipoiden besteht, während der Anteil aller anderen Bestandteile sehr gering ist.

Fricke, Parker und Ponder (1948) bestimmten die Trockenmasse der Gerüstsubstanzen. Das Stroma hämolysierter roter Blutkörperchen betrug beim Rind 1,3 %, Kaninchen 2,3 %, Mensch 3,4 % und Hund 4,2 % der Gesamtrockensubstanz.

Nach Abzug aller Nichteiweißbestandteile würde das einem Proteingehalt von $0,8 \times 10^{-12}$ gr pro menschlichem Erythrozyten entsprechen.

Es ist aber anzunehmen, daß dieses Protein nicht das einzige andersartige Eiweiß neben dem Hämoglobin darstellt. Die Präparation der Blutschatten kann durchaus dazu führen, daß Substanzen, die im Innern der Zelle vorhanden sind, mit dem Hämoglobin herausgewaschen werden, und Ponder (1948, 1955) nimmt an, daß der Nicht-Hämoglobingehalt der roten Blutkörper nicht so gering sein mag, wie er von vielen Untersuchern vermutet wird.

Dichtemessungen, die von Ponder (1948) an roten Blutkörperchen durchgeführt worden sind, wiesen eine merkwürdige Konstanz auf, wenn diese auch weniger Hämoglobin als im Normalfall enthielten. Die Korrelation zwischen Dichte und Hämoglobin betrug 0,6. Er schließt daraus, daß in der Abwesenheit von dem Hämoglobin sein Platz von einem farblosen Material etwa der gleichen Dichte eingenommen wird. Diese Substanz könnte als eine hypothetische Matrixsubstanz angenommen werden, die im umgekehrten Verhältnis zur Menge des Hämoglobin steht.

Jede Analyse der Blutkörperchenbestandteile ist mit der Gefahr verbunden, daß Fraktionen oder Teile davon bei der Präparation verloren gehen. Ponder (1949) hat deswegen die Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse interferometrisch in vitro durchgeführt. Die methodischen Schwierigkeiten überwand er, indem er die Erythrozyten durch Lezithin in Kugelform überführte. Hierbei treten keine Volumenänderungen auf, was für die Konzentrationsermittlung Bedeutung hat.

Mit dieser Methode werden sämtliche Zellbestandteile bestimmt. Sie schließt Hämoglobin, eventuell andere Proteine, Lipide, Salze und die Bestandteile der Erythrozyten-Membran ein. Andere Substanzen sind nur zu einem geringen Teil am Aufbau der roten Blutkörperchen beteiligt und beeinflussen ihren Trockenmassengehalt kaum.

Parallel dazu bestimmte er die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration des einzelnen Erythrozyten, indem er sie aus dem Volumanteil der roten Blutkörperchen und dem Gehalt an Hämoglobin des Blutes er-

mittelte. Beim Vergleich der erhaltenen Werte stellt er fest, daß die interferometrisch gefundenen Konzentrationsverhältnisse Ergebnisse lieferten, die etwa 10 % über denen mit der konventionellen Methodik ermittelten Hämoglobinkonzentration lagen. Dieses Mehr an Trockensubstanz führte er auf das Vorhandensein eines Eiweißes zurück (apparent Protein).

4. BESTIMMUNG DER TROCKEN- MASSE DER ERYTHROZYTEN MIT DEM DREISPALTINTERFERENZ- MIKROSKOP.

Erythrozyten sind schon mehrfach im Interferenzmikroskop untersucht worden. Huxley (1957) bestimmte ihr Volumen und fand, daß es mit dem aus Hämatokrit und Zellenzahl errechneten Mittelwert recht gut übereinstimmte. Allerdings untersuchte er nur eine geringe Anzahl von Zellen. Gleichzeitig stellte er fest, daß die einzelnen Erythrozyten sehr verschieden dick sind.

Barer (1952) maß erstmalig den Gangunterschied der menschlichen Erythrozyten im physiologischen Milieu, um die Trockensubstanz zu bestimmen. Er verglich den aus Fläche, Gangunterschied und spezifischem Inkrement erhaltenen Wert mit dem durchschnittlich beim Menschen vorkommenden Hämoglobingehalt des einzelnen roten Blutkörperchens und stellte eine gute Übereinstimmung beider fest. Allerdings untersuchte auch er nur eine geringe Anzahl Erythrozyten.

Die Schwierigkeit der Untersuchung besteht darin, daß, obwohl die Blutkörperchen kreisförmig sind, und die Fläche sich aus dem Durchmesser leicht ermitteln läßt, Dicke und Gangunterschied der Erythrozyten innerhalb der einzelnen Zelle infolge der Eindellung großen Unterschieden unterworfen sind. Um aber die Trockensubstanz zu erhalten, muß der Gangunterschied über die Fläche integriert werden. Es ist dies ein zeitraubendes Verfahren und gestattet nicht ein größeres Kollektiv roter Blutkörperchen zu untersuchen.

Ponder (1959) überwand diese Schwierigkeiten dadurch, daß er sie durch Lezithin in Kugelform umwandelte. Somit konnte er die Dicke leicht messen, und aus dem im Interferenzmikroskop ermittelten Gangunterschied auf die Trockensubstanz bzw. Konzentration schließen.

In Blutausstrichen trocknen die Erythrozyten recht gleichmäßig auf. Eine Beurteilung ihrer Oberfläche im Mikroskop ist weder in Hellfeld- noch in Dunkelfeldbeleuchtung möglich. Auch die Betrachtung im Phasenkontrast gibt keine zufriedenstellende Ergebnisse. Die von einem Halo umgebenen Erythrozyten sind heller als ihre Umgebung, während ihr Zentrum etwas dunkler als die Peripherie erscheint. Dies ist ein durch das Prinzip des Phasenkontrastverfahrens bedingter Effekt (Wolter, 1950) und nicht auf eine Eindellung der Erythrozyten zurückzuführen. Die in einer Richtung abbildenden Zweispaltinterferenzen erlauben es dagegen bei monochromatischer Beleuchtung die Erythrozyten-Oberfläche sicher zu beurteilen (Abb. 3).

Bei der Prüfung einer größeren Zahl roter Blutkörperchen zeigt es sich, daß ihre Oberfläche recht einheitlich konstant ist, wenn der zur Untersuchung verwendete Blutausstrich entsprechend dünn ist, die Erythrozyten isoliert liegen und eine schnelle und gleichmäßige Trocknung erfolgte. Festgestellte Höhenunterschiede lassen sich auch leicht mit den Dreispaltinterferenzen bestimmen, wenn man in ihrer Länge kleine Sonden benutzt und damit in der Lage ist, mehrere Stellen im einzelnen Erythrozyten auszumessen. Höhendifferenzen wurden dabei nur vereinzelt bis zu maximal $0,03\lambda$ festgestellt.

Diese Beobachtung gab zu dem Versuch Anlaß, die Trockensubstanz des einzelnen Erythrozyten im Ausstrichpräparat zu bestimmen, die man annehmen muß, daß die sehr geringen Inhomogenitäten, durch die nicht regelmäßige Oberfläche des Erythrozyten bedingt, bei der später zu beschreibenden Wahl der zur Untersuchung verwendeten Sondenbreite und Sondenlänge eine echte Mittelung des Gangunterschiedes bewirken, wenn die Interferenzerscheinung mit der sphärischen Linse im Dreispaltinterferenzmikroskop betrachtet wird.

Um die Trockensubstanz der Erythrozyten im Ausstrichpräparat zu bestimmen, muß man ihren Brechungsindex und das spezifische Gewicht kennen und den Gangunterschied und ihre Fläche ermitteln.

a) Ermittlung des Gangunterschiedes.

Mit einem Dreispaltinterferenzmikroskop wird der Gangunterschied bestimmt, den die Erythrozyten gegenüber der Luft mit dem Brechungsindex 1 haben. Die Sonden des Mikroskopes, die während der Messung vom Erythrozyten nicht bedeckt sind, müssen in homogenen Ausstrichbereichen liegen. Deshalb muß die Oberfläche des Eiweißfilmes einheitlich sein, und darf nur sehr geringe Höhendifferenzen aufweisen.

Es zeigte sich, daß jeder Erythrozyt von einem Eiweißsaum umgeben ist, der sich relativ weit um ihn herum ausdehnt. In einer Entfernung, die etwa seinem anderthalbfachen Durchmesser entspricht, ist er noch nachweisbar. Der Abstand der Lichtsonden im Interferenzmikroskop muß so groß sein, daß die bei der Messung vom Erythrozyten unbedeckten Spalte außerhalb dieses Plasmasaumes liegen und auch nicht vom Plasmasaum eines in der Nähe liegenden roten Blutkörperchens beeinflusst werden. Die Erythrozyten sollen deswegen im Ausstrich möglichst weit voneinander isoliert liegen. Man erreicht dies, wenn man einen kleinen Blutropfen dünn ausstreicht. Führt dies nicht zum Erfolg, so

kann man das Blut mit Eigenplasma verdünnen, wodurch regelmäßig eine entsprechend weit gewünschte Isolierung des Erythrozyten erreicht werden kann.

Die Gleichmäßigkeit der Oberfläche des Eiweißfilmes ist leicht zu prüfen. Man mißt an verschiedenen Stellen des Ausstriches den Gangunterschied und vergleicht die gefundenen Werte miteinander. Sie erwies sich als recht konstant. Die gefundenen Abweichungen lagen in den Grenzen zwischen $\pm 0,015 \lambda$. Die mittlere Abweichung aus 10 Bestimmungen betrug $0,055 \lambda$. Die absolute Dicke des Eiweißfilmes variierte je nach Ausstrichtechnik und schwankte zwischen $400 \text{ \AA}$ und $900 \text{ \AA}$. Die Erythrozyten sind nach Tierart und Ausstrich verschieden tief in ihn eingebettet. Dies kann nachgewiesen werden, indem man den Gangunterschied der Blutkörperschatten bestimmt.

Nach Betke (1958) lassen sich in den Blutausstrichen Erwachsener die Erythrozyten mit einem Zitronensäure-Phosphatpuffergemisch vollständig extrahieren. Er konnte an elektronenoptischen Aufnahmen feststellen, daß lediglich die Stromahüllen der roten Blutkörper ohne nachweisbaren Inhalt nach einer Extraktion in diesem Puffer zurückbleiben.

Versuche an Blutausstrichen verschiedener Laboratoriums- und Haus-säugetiere wiesen eine ebenfalls vollständige Eluierbarkeit des Hämoglobins aus ihren Erythrozyten nach. Die vor der Auslaugung notwendige Fixierung des Ausstriches in Äthylalkohol, wie Betke empfiehlt, hat sich für nachheriges quantitatives Arbeiten nicht bewährt. Der Alkohol fixiert nicht so, daß das Oberflächenprofil des Eiweißfilmes im Blutausstrich erhalten bleibt. Er wird teilweise abgeschwemmt, und an den roten Blutkörperchen treten Kunstprodukte auf.

Aus einer Anzahl geprüfter Fixationsmittel erwies sich die Zenker'sche Lösung als das geeignetste. Bei genügender Fixationsdauer bleibt das Oberflächenprofil des Eiweißfilmes erhalten, die Fluierbarkeit der Erythrozyten im Puffergemisch ist weiterhin vorhanden.

Der durchschnittliche Gangunterschied der enthämoglobinierten Erythrozyten verschiedener Tiere variierte in gewissen Grenzen. Es lagen die Hüllen der roten Blutkörperchen teils unter dem Eiweißfilmniveau (Hund 200 Å), teilweise darüber (Rind 180 Å). Der Gangunterschied des Erythrozyteninhaltes ergibt sich demnach aus der Differenz zweier Messungen, der der gefüllten zu der der entleerten roten Blutkörperchen.

b) Bestimmung des Brechungsindex

Der Brechungsindex der menschlichen methylalkoholfixierten roten Blutkörper wurde von Oettle (1950) zu 1,5468 - 1,5507 gefunden mit einem Durchschnittswert von 1,55. Er bestimmte ihn, indem er die Erythrozyten in Medien von verschiedenem Brechungsindex einbettete und im Phasenkontrast beobachtete. Sie sind unsichtbar, wenn Brechungsindex von Medium und Objekt gleich sind bzw. dunkel, wenn der Brechungsindex des Mediums niedriger als der der Zellen ist und erscheinen hell, wenn sie sich in einer höher brechenden Umgebung befinden. In eigenen Versuchen wurde der Brechungsindex luftgetrockneter Säugetier-Erythrozyten bestimmt.

Seine Ermittlung im Interferenzmikroskop geschieht, indem man den Gangunterschied eines Erythrozyten zweimal (Δ_I und Δ_{II}) gegenüber zwei verschieden brechenden Medien mit den Brechungsindices n_{m_1} und n_{m_2} bestimmt.

Dabei ist $\Delta_I = D (n_o - n_{m_1})$

und $\Delta_{II} = D (n_o - n_{m_2})$

woraus sich der Brechungsindex des untersuchten Erythrozyten zu

$$n_o = \frac{n_{m2} - \frac{\Delta_{11}}{\Delta_1}}{1 - \frac{\Delta_{11}}{\Delta_1}}$$

ergibt.

Es wurde der Brechungsindex von 15 verschiedenen Erythrozyten bestimmt. Er betrug im Mittel 1,562, wobei die beiden Extremwerte zu 1,554 und zu 1,572 gefunden wurden.

Bei einem Vorversuch, den Brechungsindex getrockneter Spermien zu ermitteln, ergab es sich, daß dieser nicht streng reproduzierbar war. An verschiedenen Tagen gemessen wurde er vom gleichen Tier und gleichen Ausstrich verschieden groß ermittelt. Der Brechungsindex wurde im Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe der Immersionsmethode bestimmt. Sie ist sehr empfindlich und erlaubt eine recht genaue Messung. Es wurde eine maximale Schwankung der Brechungsindices gleicher Tiere von 8 Einheiten in der 3. Dezimale festgestellt. Eine auf Grund dieser verschiedenen Werte durchgeführte Berechnung der Trockensubstanz würde eine Differenz von weniger als 1,5 % ergeben. Diese Schwankungen des Brechungsindex sind nicht so groß, daß sie eine Bestimmung der Trockensubstanz aufgetrockneter Zellen ausschließen.

Der Brechungsindex des vollkommen trockenen Hb beträgt 1,60. Wenn man annimmt, daß die Differenz zu dem gemessenen Wert von 1,562 auf dem Gehalt von Wasser zurückzuführen ist, das den Brechungsindex 1,33 hat, so würde sich ein Wassergehalt von 13 % für die luftgetrockneten Erythrozyten ergeben. Dieser Wassergehalt erniedrigt zwar den Brechungsindex, geht aber bei der Berechnung der Trockenmasse mit in den Betrag ein, da gegenüber Luft mit dem Brechungsindex 1 gemessen wird.

Legt man dem Fehler, der durch den Brechungsindex bei der Trockensubstanzbestimmung auftreten kann, die Differenz aus den Brechungsindices der luftgetrockneten und der vollständig entwässerten Erythrozyten zugrunde, so würde das einem Betrag von 6,5 % der Trockenmasse entsprechen.

c) Ermittlung der Fläche.

Da die Erythrozyten eine kreisförmige Gestalt haben, ist die Bestimmung ihres Durchmessers zur Berechnung der Fläche ausreichend. Er wird mit einem Okularmikrometer gemessen.

d) Dichte.

Für die Berechnung der Trockensubstanz wurde eine Dichte von 1,32 (Dichte des Hämoglobins) angenommen, da das Hämoglobin den größten Anteil des Erythrozyteninhaltes ausmacht.

Sind Gangunterschied und Durchmesser bestimmt, worden, so ergibt sich die Trockenmasse (T) nach der Formel

$$T = \frac{d^2 \pi}{4} \cdot f^2 \cdot D \cdot D_i$$

Hierin sind

d die Einheiten des Okularmikrometers,

f der für sie notwendige Umrechnungsfaktor, um sie in μ zu erhalten,

D die gemessene Dicke,

D_i die Dichte für das Hämoglobin.

Werden Dicke und Durchmesser des Erythrozyten in μ eingesetzt, so ist die Dimension des Ergebnisses 10^{-12} gr.

e) Die Durchführung der Messung.

Ein geeigneter Blutausrich wird im Gesichtsfeld des Dreistrahlinferenzmikroskopes so orientiert, daß die drei Lichtsonden in homogenen

Bereichen liegen. Es wird im Phasenkontrast beobachtet, um die Messung störende Ausstrichstellen wahrnehmen zu können. Nach Einschalten der sphärischen Zwischenlinse und Vorsetzen des Filters wird aus jeweils 10 Einstellungen der Abstand der beiden B-Ebenen $\pm \frac{\pi}{2}$ (Z und Z_2) ermittelt.

Die Durchmesserbestimmung erfolgt in normaler Hellfeldbeobachtung, nachdem durch seitliches Versetzen einer Blende der Beleuchtungsring für die Betrachtung im Phasenkontrast verdeckt wird. Jede Durchmesserbestimmung wird drei- bis viermal wiederholt. Der Faden des Okularmikrometers wird jeweils auf die Mitte des Randes des Erythrozyten eingestellt, wobei darauf geachtet werden muß, daß man zur Fokussierung "jene Scharfstellung wählt, bei der gerade der Umschlag von hell auf dunkel am Erythrozytenrande eintritt" (Wolter, 1950).

Hierauf wird der Erythrozyt, dessen Durchmesser bestimmt wurde, so zum Dreispalt orientiert, daß er die mittlere Sonde bedeckt. Die Spaltlänge ist so einzustellen, daß ihre Begrenzungen nahezu den Rand des Erythrozyten berühren. Die Breite der Sonden beträgt etwas mehr als die Hälfte des Erythrozytendurchmessers. Nach Einschalten der sphärischen Zwischenlinse wird im monochromatischen Licht eine verlagerte B-Ebene vermessen (Z_1'). Eine zweite Messung, vor der die Scharfstellung des Spaltbildes und des Erythrozyten überprüft wird, dient der Kontrolle und wird in gleicher Weise durchgeführt. Bei allen roten Blutkörperchen, die einen extremen Gangunterschied aufweisen, wird die Kontrollmessung so vorgenommen, daß die Lichtsonden in ihrer Richtung um 90° gedreht zum Erythrozyten gelagert werden. Es soll damit vermieden werden, daß Inhomogenitäten der Umgebung des Erythrozyten eine Verfälschung des Meßergebnisses herbeiführen können. Eine anschließende Leermessung wird in einem homogenen Objektbereich durchgeführt, der außerhalb des Eiweißsaumes des Erythrozyten liegt (Z_1). Bei allen diesen Messungen wird die Lage der B-Ebenen aus jeweils drei Einstellungen ermittelt. Es zeigte sich, daß die Interferenzbilder optimal und sehr sicher zu fixieren waren, so daß sich bei den relativ großen zu ermittelnden Gangunterschieden weitere Einstellungen zur Genauigkeitserhöhung erübrigten. Bei der Leermessung wird

die B-Ebene vermessen, die der verlagerten zugeordnet ist. Sind 10 Erythrozyten untersucht, ist die Entfernung der B-Ebenen zu kontrollieren. Es wird der Gangunterschied von 100 bzw. 50 Erythrozyten eines Tieres festgestellt.

Nach beendeter Messung wird der Blutausstrich fixiert und im Puffer enthämoglobinisiert. Die Fixationsdauer in Zenker'scher Lösung beträgt 10-15 Minuten; danach wird der Ausstrich etwa 20 Minuten im fließenden Wasser gespült. Hierauf folgt die Extraktion im Puffergemisch (0,2 mol Na_2HPO_4 und 0,1 mol Zitronensäure, Mischungsverhältnis 28,5 : 71,5) 20 Minuten lang bei 37° . Um eine vollständige Herauslösung des Hämoglobin zu erzielen, ist eine ständige Bewegung des Puffergemisches erforderlich.

Die Extraktion bereitet Schwierigkeiten, wenn der luftgetrocknete Ausstrich längere Zeit gelegen hat. Die Fixationsdauer muß verlängert und der pH des Puffers erniedrigt werden, um eine vollständige Extraktion herbeizuführen.

In einer zweiten Meßreihe wird der Gangunterschied der entleerten Erythrozyten bestimmt. Die Durchführung der Messung gestaltet sich in gleicher Weise wie die der gefüllten roten Blutkörperchen. Der durchschnittliche Gangunterschied aus 30-50 Messungen wird dem der gefüllten Erythrozyten zugezählt bzw. abgezogen.

Zur Messung wurde nur die Mittelspaltbedeckung durch den Erythrozyten gewählt. Die kombinierte Messung zwischen einer Seiten- und Mittelspaltenbedeckung, die zwar die Meßgenauigkeit weiter steigert, wobei die Seitenspaltbedeckung der sonstigen Leermessung entspricht, wurde nicht durchgeführt. Für diese Meßart muß eine noch größere Isolierung der Erythrozyten erreicht werden, die nur teilweise in den zur Verfügung stehenden Blutausstrichen gegeben war. Die Dicke (D) eines Erythrozyten ergibt sich nach der Formel

$$D = \frac{\lambda}{2(n_1 - 1)} \cdot \frac{z_1 - z_1'}{z_1 - z_2} - \frac{\lambda}{2(n_2 - 1)} \cdot \frac{z_1 - z_1''}{z_1 - z_2}$$

wenn $\Delta = D(n_0 - 1)$ und $\Delta = \frac{\lambda}{2} \cdot \frac{z_1 - z_1'}{z_1 - z_2}$ ist.

Das die Monochromasie erzeugende Filter lieferte ein Licht mit einem Maximum in der Wellenlänge $5460 \text{ \AA}$.

n_1 gibt den Brechungsindex der Erythrozyten an.

Lagen die entleerten Erythrozyten unter dem Eiweißfilmniveau, so wurde zur Berechnung dieses Betrages der Brechungsindex des getrockneten Eiweißes n_2 angenommen. (Nach Barer 1, 5400).

z_1 und z_2 sind die Koordinaten der zu vermessenden B-Ebenen. z_1 über dem Bruchstrich bildet den Mittelwert aus jeweils 10 Leermessungen. z_1' ist die Koordinate einer verlagerten B-Ebene, die durch die Phasenverzögerung der Erythrozyten bewirkt wird.



Abb. 4

Für Bereiche innerhalb einer Wellenlänge kann auch das Aussehen der A-Ebenen benutzt werden, um zu beurteilen, ob eine Phasenverzögerung etwa $0,5 \lambda$ oder 1λ bzw. $0,1 \lambda$ beträgt. In Abb. 4 ist das Interferenzbild eines Dreispaltes zu sehen, in dessen Mitte ein Erythrozyt eine Phasenverzögerung bewirkt. Die Betrachtung geschieht mit der Zylinderlinse. Die Interferenzerscheinung ist nur im Bereich des Erythrozyten beeinflusst. Es ist die A-Ebene mit dem Gangunterschied 0 eingestellt. Durch den Erythrozyten wird das Interferenzbild so verändert, daß in seinem Bereich die Interferenzlinien um eine halbe Periode

versetzt sind. Dieses Aussehen ist aber charakteristisch für die A-Ebenen mit einem Gangunterschied, der ein ungeradzahlig Vielfaches von π ist.

Da der Gangunterschied des Erythrozyten aber nicht 3π oder mehr betragen kann, muß seine Phasenverzögerung etwa $\frac{\lambda}{2}$ sein.

Schwierigkeiten können bei der gegenseitigen Zuordnung der B-Ebenen auftreten, da sie sich ihrem Aussehen nach nicht unterscheiden lassen. Man geht deshalb folgendermaßen vor:

Durch Beobachtung im Zweispalt ermittelt man den ungefähren Gangunterschied des Erythrozyten. Es ist leicht festzustellen, ob er sich im Bereich von $0,1\lambda$, $0,5\lambda$ oder 1λ befindet. Durch die Art der Spaltbedeckung weiß man, in welcher Richtung die Interferenzebenen verschoben sind, und es ist einfach zu entscheiden, wo eine bestimmte B-Ebene bei einem bestimmten Gangunterschied liegt, und welches die B-Ebene der Leermessung mit dem Gangunterschied + oder - ist, die ihr zugeordnet werden muß.

Parallel zur Bestimmung der Trockensubstanz wurde die durchschnittliche Beladung des einzelnen Erythrozyten mit Hämoglobin bestimmt. Sie erfolgt aus dem Verhältnis von Hämoglobingehalt des Blutes zur Zahl der Erythrozyten.

Der HB-Gehalt wurde spektrophotometrisch nach der Cyan-HB-Methode gemessen. Die Ermittlung der Erythrozytenzahl geschah nach dem üblichen Verfahren in der Bürkerkammer. Es wurden jeweils 160 Felder ausgezählt. Dadurch wird ihre Zahl bis auf 2,5 % genau bestimmt.

f) Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung des Gangunterschiedes.

Hat das Eiweißfilmniveau zwischen den zwei Spalten, die während der Messung vom Erythrozyten nicht bedeckt sind, eine Höhendifferenz, so wird der Gangunterschied der Erythrozyten falsch bestimmt. Da man

nicht annehmen kann, daß sich dieser Höhenunterschied kreisförmig um den Erythrozyten erstreckt, wird dieser erkannt, wenn die Kontrolluntersuchung in der angegebenen Weise vorgenommen wird. Es wurde der Gangunterschied zahlreicher Erythrozyten auf diese Art durch zwei Messungen überprüft, und es konnten keine größeren Abweichungen festgestellt werden, als sie der geringen Inhomogenität der Eiweißoberfläche entsprechen. Diese Kontrolle wurde deshalb nur noch für Erythrozyten mit einem extremen Gangunterschied angewendet. Auch hier war es selten, daß eine Differenz zwischen den zwei ermittelten Gangunterschieden gefunden wurde, die größer als $0,015 \lambda$ war.

Da der Eiweißfilm eine Dicke besitzt, die etwa 10-15% der des Erythrozyten ausmacht, war zu prüfen, ob die Erythrozyten eines untersuchten Ausstriches gleichmäßig im Plasmafilm gelagert sind. Für die enthämoglobinisierten roten Blutkörperchen kann man eine gleiche Dicke annehmen. Aus ihrem Gangunterschied kann man sich daher ein Urteil über ihre relative Lagerung im Eiweißfilm erlauben. Es wurde die Streuung des Gangunterschiedes der enthämoglobinisierten Erythrozyten festgestellt, die einen Wert von etwa $0,0045 \lambda - 0,0065 \lambda$ ergaben. Dieser Wert liegt etwas über dem, der für die Streuung des Gangunterschiedes der Eiweißoberfläche ermittelt wurde. Er läßt aber annehmen, daß die roten Blutkörperchen recht einheitlich im Plasmafilm des jeweiligen Blutausriches gelegen sind. Eine Erklärung für die Feststellung, daß die Erythrozytenschatten teils geringgradig über dem Eiweißniveau lagen, während andere unterhalb desselben festgestellt wurden, kann nicht gegeben werden. Es war zu prüfen, ob diese unterschiedliche Einbettung der Erythrozyten nicht durch mangelnde Herauslösung des Hämoglobins aus den Erythrozyten vorgetäuscht wird. Die Ausstriche wurden zu diesem Zweck unterschiedlich lang der Pufferwirkung ausgesetzt. Es ergaben sich aber trotz der zeitlichen Unterschiede in der Behandlung der Erythrozyten keine merkbaren Unterschiede, und auch durch einen extrem langen Aufenthalt im Puffergemisch konnte keine weitere Dickenabnahme der Erythrozytenschatten festgestellt werden. Für die Annahme, daß die Erythrozyten nicht vollständig entleert sind, muß man voraussetzen, daß die Extraktion auf

einer gewissen Stufe stehengeblieben ist. Es wäre dann erstaunlich, wie gleichmäßig das für alle Erythrozyten geschieht. Die ermittelte Standardabweichung wurde am Rind geprüft; sie ergab $0,0045 \lambda$. Die Erythrozyten dieses Tieres lagen aber $180 \text{ \AA}$ über dem Eiweißfilmniveau. Parallel hierzu wurden die Erythrozyten eines Kalbes enthämoglobinisiert, aus denen das fetale Hämoglobin durch den Puffer nicht herausgelöst werden soll. Diese im Puffer behandelten Erythrozyten zeigten einen durchschnittlichen Gangunterschied von $0,10 \lambda$. Daneben wurde versucht, die absolute Dicke der hämolysierten roten Blutkörper zu bestimmen. Die Ergebnisse waren aber nicht sehr einheitlich. Die Ratten-Erythrozyten ließen sich schlecht vollständig hämolysieren. Für die Kaninchen wurden Werte zwischen $180 \text{ \AA}$ und $250 \text{ \AA}$ gemessen, wenn man seiner Berechnung den Brechungsindex des getrockneten Eiweißes von $1,54$ zugrunde legt. Die Messung geschah gegenüber Luft, wobei die Erythrozytenschatten auf einen Objektträger aufgetrocknet waren. Der Erythrozyt im Blutaussstrich müßte demnach direkt dem Plasmafilm aufliegen, wenn man für ihn auch eine Dicke von $180 \text{ \AA}$ bis $250 \text{ \AA}$ annimmt.

Um den Maximalfehler abzuschätzen, der durch diese scheinbar entleerten Erythrozytenhüllen hervorgerufen werden kann, sei der Unterschied, der zwischen den Erythrozyten des Hundes und denen des Rindes im Gangunterschied besteht, auf die Trockenmasse des Rindes berechnet. Es ergibt sich dabei eine Differenz von $6,3\%$, die zu der berechneten Trockensubstanz des Rindes zugezählt werden müßte.

g) Fehlermöglichkeiten bei der Bestimmung des Durchmessers.

Köhler und Loos (1941) stellten eine Diskrepanz zwischen den Durchmessern roter Blutkörperchen bei Phasenkontrast- und Hellfeldbeobachtung fest. Die im Hellfeld gemessenen ergeben dabei $10\text{-}15\%$ größere Werte als die im Phasenkontrast bestimmten. Wolter (1950) wies nach, daß die im Phasenkontrast ermittelten Werte nicht den wirklichen Ver-

hältnissen entsprechen; die Durchmesserbestimmung im Phasenkontrast ist somit unzulässig.

Die Differenz des Brechungsindex zwischen den Erythrozyten und der sie im Ausstrichpräparat umgebenden Luft ist sehr groß. Dies hat zur Folge, daß die Strahlen an der Erythrozytenbegrenzung (Phasenkante) besonders stark abgelenkt werden, was sich ungünstig auf die Abbildung des Erythrozytenrandes auswirkt. Dieser "atmet" beim Heben und Senken der Einstellebene. Wolter (1950) betont, daß die Durchmesserbestimmung unter in vitro Verhältnissen nur bei einer bestimmten Mikroskopeinstellung geschehen darf, wie sie weiter oben angegeben wurde. Im besonderen Maße trifft das für die Untersuchung der Erythrozyten im Ausstrichpräparat zu.

Bei der Berechnung der Trockenmasse der Erythrozyten werden diese als Zylinder angenommen. Aus den Aufnahmen ist aber zu entnehmen, daß diese Annahme nicht streng für sie zutrifft, sondern ihr Rand schräg abfällt. Höhendifferenzen der Erythrozytenoberfläche, die im Bereich der sie bedeckenden Sonden liegen, werden berücksichtigt, da sie eine Mittelung des Gangunterschiedes bewirken. Es kann aber nicht der allmähliche Anstieg des Erythrozytenrandes erfaßt werden. Die Spaltbedeckung darf auch nicht zu weit an den Erythrozytenrand gelegt werden, um zu verhindern, daß Lichtbüschel mit erfaßt werden, die den Erythrozyten nicht durchsetzt haben.

Nimmt man an, daß bei der Durchmesserbestimmung der äußerste Rand der Erythrozyten gemessen wurde, so kann in die Trockenmassenberechnung ein Fehler von 14% eingehen, wenn man seiner Abschätzung die Verhältnisse zugrunde legt, wie sie aus den Interferenzbildern Abb. 2 und 3 zu entnehmen sind. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß der allmähliche Anstieg des Erythrozytenrandes mit auf den Plasmasaum zurückzuführen ist, der den Erythrozyten umgibt.

Wird der Durchmesser jedoch in der Weise bestimmt, daß als äußere Begrenzung des Erythrozyten die Mitte dieses Randes angenommen wird, hebt sich der Fehler, der durch die nicht streng zylindrische Form bedingt wird, auf.

In die Berechnung der Trockensubstanz gehen die bei der Ermittlung des Gangunterschiedes und der Durchmesserbestimmung aufgetretenen Meßfehler ein.

Um den Gangunterschied zu erhalten, werden acht verschiedene Einstellungen benötigt. Dennoch ist der von ihnen bewirkte Meßfehler sehr gering. Er beträgt etwa $\pm 0,9\%$. Dieser Wert entspricht der Genauigkeit einer interferometrischen Messung. Es ist bemerkenswert, daß darin schon die geringen Unebenheiten des Plasmafilmes enthalten sind, sowie die etwas höher liegende Streuung für den Gangunterschied der leeren Erythrozytenhüllen.

Bei der Durchmesserbestimmung war der mittlere Fehler des Mittelwertes nicht einheitlich und schwankte zwischen $0,03\mu$ und $0,07\mu$ für die einzelnen Erythrozyten. Da bei der Trockenmassenberechnung das Durchmesserquadrat in die Rechnung eingeht, vergrößert sich auch dieser Fehler entsprechend.

Aus Durchmesser und Gangunterschiedbestimmung resultiert ein Gesamtfehler für die erhaltenen Trockensubstanzwerte von $\pm 2,2\%$. Bei seiner Berechnung wurde der Höchstwert des mittleren Fehlers des Mittelwertes in der Durchmesserbestimmung von $0,07\mu$ angenommen.

5. ERGEBNISSE

Es wurden die Erythrozyten zweier Rinder, zweier Kaninchen, zweier Ratten und eines Hundes untersucht.

In Tabelle 1 sind die ermittelten Werte für die Trockenmasse, den Durchmesser und den Gangunterschied der einzelnen Tiere zusammengestellt. Sie sind die Durchschnittswerte der jeweils untersuchten Erythrozyten. Daneben sind der Hämoglobingehalt des Blutes und die Zahl der Erythrozyten in mm^3 angeführt, aus denen sich die durchschnittliche

Hämoglobinkonzentration des einzelnen roten Blutkörpers ergibt.

In Tabelle 2 ist die mittlere Abweichung für die Werte der Trockenmasse, des Gangunterschiedes und Durchmessers aufgeführt.

Tabelle 1

Kaninchen I

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	100
Mittlerer Gangunterschied:	0,587 λ
Mittlerer Durchmesser:	6,46 μ
Durchschnittl. Wert d. Trockensubstanz:	24,65 $\pm$ 0,54 $\times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	10,66 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	4,8 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	22,13 $\pm$ 0,16 $\times 10^{-12}$ gr

Kaninchen II

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	50
Mittlerer Gangunterschied:	0,627 λ
Mittlerer Durchmesser:	6,82 μ
Durchschnittl. Wert d. Trockensubstanz:	29,7 $\pm$ 0,64 $\times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	10,64 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	4,045 Mill. in mm ³
Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	26,8 $\pm$ 0,22 $\times 10^{-12}$ gr

Tabelle 1

Ratte I

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	100
Mittlerer Gangunterschied:	0,453 λ
Mittlerer Durchmesser:	6,61 μ
Durchschnittl. Wert der Trockensubstanz:	19,81 $\pm$ 0,44
Hämoglobingehalt des Blutes:	13,9 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	8,06 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	17,24 $\pm$ 0,1 $\times 10^{-12}$ gr

Ratte II

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	100
Mittlerer Gangunterschied:	0,445 λ
Mittlerer Durchmesser:	6,5 μ
Durchschnittl. Wert der Trockensubstanz:	18,68 $\pm$ 0,41 $\times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	14,34 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	8,73 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	16,43 $\pm$ 0,1 $\times 10^{-12}$ gr

Tabelle 1

Rind I

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	50
Mittlerer Gangunterschied:	0,580 λ
Mittlerer Durchmesser:	5,52 μ
Durchschnittl. Wert der Trockensubstanz:	$18,26 \pm 0,4 \times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	7,82 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	11,62 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	$14,86 \pm 0,09 \times 10^{-12}$ gr

Rind II

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	50
Mittlerer Gangunterschied:	0,6002 λ
Mittlerer Durchmesser:	5,27 μ
Durchschnittl. Wert der Trockensubstanz:	$17,043 \pm 0,38 \times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	7,86 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	11,4 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	$14,5 \pm 0,08 \times 10^{-12}$ gr

Tabelle 1

Hund

Zahl der untersuchten Erythrozyten:	50
Mittlerer Gangunterschied:	0,6828 λ
Mittlerer Durchmesser:	6,01 μ
Durchschnittl. Wert der Trockensubstanz:	24,83 $\pm$ 0,55 $\times 10^{-12}$ gr
Hämoglobingehalt des Blutes:	13,9 gr/100 cm ³
Zahl der Erythrozyten:	6,19 Mill. in mm ³
Durchschnittl. Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten:	22,46

Tabelle II

Streuung der Werte bei den einzelnen Tieren.

Rind I

Gangunterschied: 0,112 λ
Durchmesser: 0,7 μ
Trockensubstanz: 6,0 gr $\times 10^{-12}$ gr

Rind II

Gangunterschied: 0,110 λ
Durchmesser: 0,81 μ
Trockensubstanz: 6,6 $\times 10^{-12}$ gr

Ratte I

Gangunterschied: 0,102 λ
Durchmesser: 1,01 μ
Trockensubstanz: 6,7 $\times 10^{-12}$ gr

Ratte II

Gangunterschied: 0,140 λ
Durchmesser: 0,76 μ
Trockensubstanz: 6,1 $\times 10^{-12}$ gr

Hund

Gangunterschied: 0,118 λ
Durchmesser: 0,78 μ
Trockensubstanz: 5 $\times 6 \times 10^{-12}$ gr

Kaninchen I

Gangunterschied: 0,182 λ
Durchmesser: 1,18 μ
Trockensubstanz: 6,3 $\times 10^{-12}$ gr

Kaninchen II

Gangunterschied: 0,140 λ
Durchmesser: 1,01 μ
Trockensubstanz: 6,8 $\times 10^{-12}$ gr

DISKUSSION.

Die im Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragenen Summenhäufigkeitsprozente für den Durchmesser und Gangunterschied lassen eine Normalverteilung dieser Werte erkennen. Dies trifft auch für die sich aus Durchmesser und Gangunterschied ergebende Trockenmasse zu. In Abb. 5 sind diese Werte für Kaninchen II im Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragen. (S. Abb. 5)

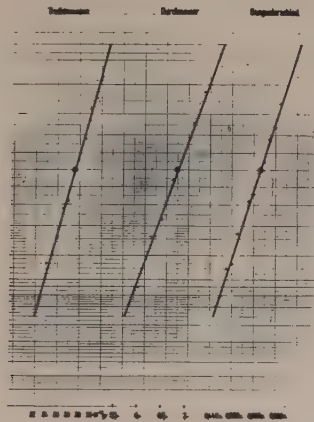


Abb. 5

Aus den Tabellen ist zu entnehmen, daß die Standardabweichungen für den Gangunterschied und die Durchmesser der Kaninchenerythrozyten von den sich in etwa entsprechenden Werten der anderen untersuchten Tiere abweichen. Sie sind merklich höher. Auffallend ist, daß die Standardabweichung für die Trockenmasse aller Tiere in etwa in den gleichen Bereichen liegt.

Für Kaninchen I wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Gangunterschied und Durchmesser der Erythrozyten besteht. Wurden sie in einem Koordinatennetz gegeneinander aufgetragen, zeigte die Verteilung dieser Werte ein parabelförmiges Aussehen. Es wurde die Korrelation zwischen Gangunterschied und dem reziproken Durchmesserquadrat

$$\frac{I}{\text{Durchmesser}^2}$$

festgestellt. Sie beträgt 0,67. Man kann durchaus eine Tendenz zur Konstanthaltung des Volumens ersehen. Den kleinen Durchmessern sind hohe Gangunterschiede zugeordnet und umgekehrt.

Auf Grund der Untersuchungen kann festgestellt werden, daß die Trockensubstanz des Erythrozyteninhaltes höher ist, als es deren Hämoglobinkonzentration entspricht. Die durchgeführten Untersuchungen erlauben jedoch keine Aussage über die Art der Substanzen, die diese Erhöhung der Trockensubstanz herbeiführen. Verschiedene Untersucher glauben aus ihren Beobachtungen auf eine Innenstruktur im Erythrozyten schließen zu können. Für diese Vermutung können die Untersuchungen nur insoweit eine Bestätigung sein, als das Vorliegen von Substanzen festgestellt werden konnte, die den Trockensubstanzgehalt des Erythrozyten gegenüber deren Hämoglobinkonzentration erhöhen.

Abderhalden gibt diesen Anteil für das Rind mit 22,5% und 16,5%, für das Kaninchen mit 10%, für den Hund mit 7,9% und 11,9% an.

Die eigenen Untersuchungen ergaben Werte, die beim Rind 14,9 und 18,8% (+ 1,3% Stroma), bei der Ratte 13 und 12%, beim Hund 9,8% (+ 2% Stroma), und beim Kaninchen 7,9 und 10% (2,3% Stroma) höher als die Hämoglobinkonzentration lagen.

Die für das Kaninchen gefundenen Werte entsprechen den von Abderhalden gemachten Angaben.

Die Werte für das Rind liegen bei Abderhalden und in den eigenen Versuchen in den gleichen Bereichen. Für den Hund wurde dagegen ein höherer Anteil an Trockenmasse ermittelt.

Es kann vermutet werden, daß der in den Säugetier-Erythrozyten festgestellte erhöhte Trockensubstanzgehalt gegenüber der ermittelten Hämoglobinkonzentration auf ein bisher nicht näher identifiziertes Eiweiß zurückzuführen ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

Das Dreispaltinterferenzmikroskop ist geeignet, den Gangunterschied der Erythrozyten im Blutausschlag mit hoher Genauigkeit ($\pm 0,9\%$) festzustellen.

Ist daneben ihr Brechungsindex (n_o) bekannt, erhält man ihre Dicke (D) zu $D = \Delta (n_o - 1)$.

Wird außerdem der Durchmesser bestimmt, so ergibt sich die Trockensubstanz der Erythrozyten aus dem Produkt von Durchmesser². $\frac{\pi}{4}$. Dicke . spez. Gewicht. Die Oberflächengestalt der im Blutausschlag aufgetrockneten roten Blutkörperchen und die geeignete Wahl der Sondenlänge und Sondenbreite im Dreispaltinterferenzmikroskop bewirken, daß der gemessene Gangunterschied einen Mittelwert darstellt, der sofort in die Rechnung eingehen kann. Die für seine Bestimmung benötigte Zeit ist kurz. Es kann eine größere Anzahl roter Blutkörperchen untersucht werden. Die Möglichkeit, die Erythrozyten im Blutausschlag zu enthämoglobinisieren, erlaubt es, die Trockensubstanz des Erythrozyteninhaltes mit einer Genauigkeit von $\pm 2,2\%$ zu ermitteln.

Es wurden die Erythrozyten zweier Kaninchen, zweier Rinder, zweier Ratten und eines Hundes untersucht. Der durchschnittliche Trockensubstanzgehalt des Erythrozyteninhaltes betrug

beim Rind	$18,26 \pm 0,40 \times 10^{-12}$ gr
und	$17,04 \pm 0,38 \times 10^{-12}$ gr
bei der Ratte	$19,81 \pm 0,44 \times 10^{-12}$ gr
und	$18,68 \pm 0,41 \times 10^{-12}$ gr
beim Kaninchen	$24,65 \pm 0,54 \times 10^{-12}$ gr
und	$29,70 \pm 0,64 \times 10^{-12}$ gr
beim Hund	$24,83 \pm 0,55 \times 10^{-12}$ gr .

Parallel hierzu wurde die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration der untersuchten Erythrozyten aus dem Hämoglobingehalt des Blutes und der Zahl der Erythrozyten festgestellt.

Der mit dem Dreispaltinterferenzmikroskop ermittelte Trockensubstanzgehalt lag beim

Rind	um 18,8 und 14,9 %
Ratte	um 13 und 12 %
Kaninchen	um 7,9 und 10 %
Hund	um 9,8 %

höher als die im Parallelversuch ermittelten Hämoglobinkonzentration.

LITERATURVERZEICHNIS.

- | | |
|----------------------------------|---|
| Adair, G. S.
Robinson, M. E. | Die spezifischen Refraktionsinkremente von
Serum-Albumin und Serum-Globulin
Biochem. J. <u>24</u> , 993, 1930 |
| v. Ardenne und
H. Westmeyer | Über ein neues Ultramikrotom einfacher Bau-
art, Optik <u>16</u> , 193, 1959 |
| Albritten, C. | Standard Values In Blood, Philadelphia und
London Saunders, 1952 |
| Barer, R. | Interference Microscopy and Mass Determi-
nation
Nature <u>169</u> , 366, 1952 |
| Barer, R. und
Josef, S. | Refraktometrie lebender Zellen
Quart. J. Microscop. Sci.
<u>95</u> , 399, 1954 |
| Beams, H. W. und
Hines, E. B. | Stratification of the Rat
Erythrocyte bey
Ultracentrifuging
Anat. Record <u>90</u> , 155, 1944 |
| Betke, K.
Kleihauer, E. | Fetaler und bleibender Blutfarbstoff in Ery-
throzyten und Erythroblasten von Menschen
Blut IV <u>4</u> , 241, 1958 |
| Bürker in
Landois Rosemann: | Physiologie des Menschen
München / Berlin
Urban & Schwarzenberg 1950 |

- Dukes, H. H. The Physiology of Domestic Animals,
New York, Comstock 1942
- Fleischmann, R. und
Schopper, H. Verfahren zur genauen Messung absolu-
ter Lichtphasen an nicht absorbierenden
und absorbierenden Schichten
Z. Physik 130, 304, 1951
- Huxley, A. F. Das Interferenzmikroskop und seine An-
wendung in der biologischen Forschung
Naturwissenschaften, 44, 189, 1957
- Kanitz, A. in
Oppenheimer, C. Handbuch der Biochemie des Menschen
und der Tiere
Jena 2. Aufl. Bd. 1925
- Köhler, A.
Loos, W. Das Phasenkontrastverfahren und seine
Anwendung in der Mikroskopie
Naturwissenschaften 29, 49, 1941
- Menzel, E. Dichtenmessung mikroskopischer Ob-
jekte mit den Dreistrahlintereferenzen
Naturwissenschaften 39, 398, 1952
- Menzel, E.
Schmidt, K. Dickenmessung an Objekten geringer
lateralen Ausdehnung
Z. angew. Physik 6, 409, 1954
- Menzel, E. Dickenmessung mikroskopischer Objekte
mit Dreispalt- und Zweispaltinterferen-
zen
Optik 14, 151, 1957
- Oettle EXPERIMENTS WITH A VARIABLE
AMPLITUDE AND PHASE MICROSCOPE 232

J. Royal Micr. VOL. LXX. SERIES III
Soc. 232, 1950

- Ponder, E. Hemolysis And Related Phenomena New York
Grune & Stratton 1948
- Ponder, E. Red Cell Structure
And Its Breakdown
Protoplasmatologica
Band X 1955
- Ponder, E. Haemoglobin and "Apparent Protein"
in the Human red cell
Nature 183, 1959
- Stern, K. G. On the Electrophoretic Pattern
Reiner, M. und of Red Blood Cell Proteins
Silber, R. H. J. Biol. Chem. 161, 731, 1945
- Strohmeier, K. + Z. Physik 135, 44, 1953
+)
- Wolter, H. Zur Abbildung zylindrischer Phasenobjekte el-
liptischen Querschnitts
Ann. Physik 6. F. 7, 147, 1950
+)
Bemerkungen zur optischen Dickenmessung mit.
Dreistrahlinterferenzen.
- Väisälä, Y. Neue Methoden zur Untersuchung der Objektive
nebst Bemerkungen über die Beurteilung ihrer
Güte
Ann. Univ. Fennicae Aboensis A 1 No. 2 1922
- Zernike, F. A precision method for measuring small phase
differences
J. Opt. Soc. Am. 40, 326, 1950

LEBENS LAUF.

Am 11. Juli 1928 wurde ich, Günther Reißhauer, in Göhritz Kreis Querfurt geboren. Mein Vater ist der Volksschullehrer Erich Reißhauer, meine Mutter, dessen Ehefrau, Wally Reißhauer, geborene Thieme.

In Göhritz besuchte ich 4 Jahre die Grundschule und wechselte 1939 in die Oberschule für Jungen nach Querfurt über. Im Januar 1944 wurde ich als Luftwaffenhelfer einberufen und kam 1945 in amerikanische Kriegsgefangenschaft, aus der ich im August desselben Jahres entlassen wurde.

Um meine unterbrochene Schulausbildung zu beenden, besuchte ich im Herbst 1946, nachdem ich in der Zwischenzeit in der Landwirtschaft gearbeitet hatte, nochmals die Oberschule für Jungen in Querfurt und legte am 18. 6. 1948 die Reifeprüfung ab. Danach war ich wieder in der Landwirtschaft tätig.

Am 1. Mai 1954 begann ich an der Justus Liebig-Hochschule in Gießen das Studium der Veterinärmedizin. Am 24. April 1956 bestand ich die Tierärztliche Vorprüfung. Während des Wintersemesters 1956/57 studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule in Wien. Im Sommersemester 1957 setzte ich das Studium an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Hochschule fort und bestand am 2. Februar 1959 die Tierärztliche Prüfung.

Danach war ich am Veterinär-Physiologischen Institut der Justus Liebig-Universität tätig, um meine Dissertation fertigzustellen.

DANKWORT

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. W. Boguth für die vielseitigen Anregungen und die jederzeitige, wohlwollende Unterstützung während der Arbeit danken.

Der Firma Ernst Leitz, Wetzlar, insbesondere den Herren Dr. Grehn und Dr. Walter, habe ich für die Überlassung und Herstellung der optischen Einrichtungen zu danken, die die Durchführung der Arbeit ermöglichten.

